

Aus dem Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Einfluss des Hämagglutinins und der Neuraminidase auf die Influenza-A-Virus Sensitivität gegenüber humanen Wirtsfaktoren

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Thomas Gerlach
aus Viersen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 12.07.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Dr. Mikhail Matrosovič

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bauer

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 INFLUENZA-A-VIREN	5
1.1.1 <i>Taxonomie</i>	5
1.1.2 <i>Verbreitung der Influenza-A-Viren</i>	6
1.2 MORPHOLOGIE UND GENETIK	7
1.2.1 <i>Morphologie</i>	7
1.2.2 <i>Genomaufbau und kodierte Proteine</i>	8
1.3 REPLIKATIONSZYKLUS	10
1.4 HÄMAGGLUTININ	11
1.4.1 <i>Rezeptorbindung und Rezeptorspezifität</i>	13
1.4.2 <i>pH-induzierte HA-vermittelte Fusion</i>	17
1.4.3 <i>Stabilität und Transmission</i>	18
1.5 NEURAMINIDASE	20
1.6 EPIDEMIOLOGIE	22
1.6.1 <i>Pandemien</i>	22
1.6.2 <i>Saisonale Influenza</i>	23
1.6.3 <i>Zoonotische Infektionen durch aviäre Influenza</i>	24
1.7 ANGEBORENE IMMUNANTWORT	25
1.7.1 <i>Mucus in den Atemwegen</i>	25
1.7.2 <i>Angeborene Immunantwort gegen IAV</i>	27
1.7.2.1 <i>IFITM-Protein Familie</i>	28
1.7.2.2 <i>Viperin und Tetherin</i>	29
1.7.3 <i>Interaktion viraler Proteine mit dem IFN-System</i>	30
1.8 ZIELSETZUNG	31
2 MATERIAL	32
2.1 PLASMIDE	32
2.2 PRIMER	33
2.3 NICHT-REKOMBINANTE VIREN	34
2.4 REKOMBINANTE VIREN	35
2.5 ENZYME	36
2.6 CHEMIKALIEN	36
2.7 MEDIEN	37
2.8 ZELLINIEN	38
2.9 PRIMÄRE ZELLKULTUREN	39
2.10 ANTIKÖRPER	39
2.11 MUCUSPROBEN	40
2.12 FETUINE UND POLYMERE	41
2.13 LEKTINE	41
2.14 LÖSUNGEN	42
2.15 REAKTIONSKITS	44
2.16 LABOREQUIPMENT	44
2.17 VERBRAUCHSMATERIALIEN	45
2.18 SOFTWARE	46

3	METHODEN	47
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	47
3.1.1	RNA-Isolierung.....	47
3.1.2	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	47
3.1.3	Mutagenese.....	48
3.1.4	Transformation.....	50
3.1.5	Sequenzierung	51
3.2	ZELLKULTUR	51
3.3	HERSTELLUNG REKOMBINANTER VIREN	52
3.3.1	Transfektion von HEK293-Zellen.....	53
3.3.2	Infektion von MDCK-Zellen.....	54
3.3.3	Infektion von embryonierten Hühnereiern	54
3.4	VIRUSQUANTIFIZIERUNG.....	55
3.4.1	Titration mittels einzyklischer Replikation.....	55
3.4.2	Titration mittels Plaque-Assay.....	55
3.4.3	Immunhistochemische Färbung	56
3.5	VIRUSCHARAKTERISIERUNG	57
3.5.1	Sensitivität rekombinanter Viren gegenüber niedrigem pH.....	57
3.5.2	Inhibition der Infektion durch Ammoniumchlorid.....	58
3.5.3	Detektion der pH-abhängigen Konformationsänderung im HA	60
3.5.4	Virusreplikation in verschiedenen Modellsystem der humanen Atemwege.....	61
3.5.4.1	Replikation in HTBE-Kulturen	62
3.5.4.2	Replikation in HAEC-Kulturen.....	62
3.5.4.3	Replikation in Calu3-Zellen	63
3.5.5	Virusinhibition durch bronchialen Mucus in verschiedenen Zellsystemen	63
3.5.5.1	Einfluss der NA auf die Virusneutralisation durch Mucus: NA-Aktivität	64
3.5.6	Bindungsaffinität in MDCK-Zellen	65
3.5.7	Solid-Phase Fetuin binding Assays	65
3.5.7.1	Bestimmung der optimalen Virusverdünnung	66
3.5.7.2	Direkter Fetuin-Bindungs-Assay.....	66
3.5.7.3	Kompetitiver Bindungsassay.....	68
3.5.8	Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status	68
3.5.8.1	Virusinhibition durch IFN- β -induzierte Effektormoleküle beim Viruseintritt in A549- und Calu3-Zellen.....	69
3.5.8.2	Virusinhibition durch IFN- β -induzierte Effektormoleküle in HAEC- und HTBE-Kulturen.....	69
3.5.8.3	Replikation von Viren in Anwesenheit von IFN- β	70
3.5.9	Virusinhibition durch humanes IFITM2 und IFITM3.....	71
3.6	MUCUSCHARAKTERISIERUNG	71
3.6.1	Entnahme von Mucusproben.....	71
3.6.2	Nachweis von IAV-Rezeptoren mittels spezifischer Lektine.....	72
3.6.3	Fraktionierung des Mucus	73
3.6.4	Detektion von Inhibitoren im Mucus	75
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	75
4	ERGEBNISSE	76
4.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG REKOMBINANTER VIREN	76
4.1.1	Herstellung rekombinanter Viren.....	76
4.1.2	Rezeptorspezifität der rekombinanten Viren	77
4.1.3	Bestimmung der fusogenen Eigenschaften der rekombinanten Viren.....	78

4.1.3.1	pH-induzierte Konformationsänderung des Hämagglutinins	78
4.1.3.2	Inhibition der Infektion durch Ammoniumchlorid	79
4.1.3.3	Virusinaktivierung durch niedrigen pH	79
4.2	REPLIKATIONSVERHALTEN REKOMBINANTER INFLUENZA-A-VIREN	81
4.2.1	Replikationsverhalten in Calu3-Zellen	82
4.2.2	Replikationsverhalten in primären humanen tracheo-bronchialen Epithelzellen (HTBE)	82
4.2.3	Replikationsverhalten in primären humanen Typ II-Pneumozyten (HAEC)	82
4.3	INHIBITION DER IAV-INFEKTION DURCH HUMANEN ATEMWEGSMUCUS	83
4.3.1	Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in MDCK-Zellen	84
4.3.2	Bindungsaffinität von Viren in MDCK-Zellen	85
4.3.3	Verteilung der Sialinsäuren in humanem Mucus	86
4.3.4	Einfluss des NA-Inhibitors Oseltamivircarboxylat auf die Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus	87
4.3.5	Vergleich der Virusneutralisation durch bronchialen Mucus in MDCK- und MDCK-SIAT-Zellen	88
4.3.6	Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in Calu3-Zellen	89
4.3.7	Vergleich der Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in HTBE-Kulturen und MDCK-Zellen	90
4.3.8	Bindungsinhibition durch nasalen und bronchialen Mucus	91
4.4	CHARAKTERISIERUNG VON BRONCHIALEN UND NASALEN MUCUSPROBEN	93
4.4.1	Inhibitorische Komponenten im Mucus	93
4.4.2	Fraktionierung des Mucus	95
4.5	EINFLUSS DES HAS UND DER NA AUF DIE SENSITIVITÄT DER VIREN GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTI-VIRALEN STATUS	97
4.6	EINFLUSS DER HA-VERMITTELTEN FUSION AUF DIE SENSITIVITÄT GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTIVIRALEN STATUS	98
4.6.1	Herstellung rekombinanter Viren mit Fusions-pH beeinflussenden Punktmutationen im HA	98
4.6.2	Detektion der pH-induzierten Konformationsänderung	99
4.6.3	Sensitivität gegenüber NH ₄ Cl	99
4.6.4	Bestimmung der Sensitivität von rekombinanten Fusionsmutanten gegenüber IFN-β	100
4.6.5	Inhibition der Infektion durch IFN-induzierte Effektormoleküle in primären HAEC- und ausdifferenzierten HTBE-Kulturen	101
4.7	EINFLUSS DER REZEPTORBINDUNGSEIGENSCHAFTEN AUF DIE SENSITIVITÄT GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTIVIRALEN STATUS	102
4.7.1	Herstellung rekombinanter Viren mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität	102
4.7.2	Sensitivität gegenüber NH ₄ Cl	102
4.7.3	Inhibition der Infektion rekombinanter Rezeptorbindungsmutanten durch IFN-induzierte Effektormoleküle	103
4.8	EINFLUSS DER NA AUF DIE SENSITIVITÄT GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTIVIRALEN STATUS	103
4.8.1	Sensitivität rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA gegenüber NH ₄ Cl	104
4.8.2	Inhibition der Infektion rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA durch IFN-induzierte Effektormoleküle	105
4.9	INHIBITION DER INFEKTION DURCH HUMANE IFITM-PROTEINE	106
4.9.1	Sensitivität gegenüber humanem IFITM2 und IFITM3 in der frühen Replikationsphase	106
4.9.2	Sensitivität gegenüber humanem IFITM2 und IFITM3 nach mehreren Replikationszyklen	107

4.10	MULTIZYKLISCHE REPLIKATION IN ANWESENHEIT VON IFN-B	109
4.10.1	<i>Replikation von HK/68-WT und HK/68-H17R in Anwesenheit von IFN-β</i>	<i>109</i>
4.10.2	<i>Replikation rekombinanter Viren mit HA und NA repräsentativer IAV.....</i>	<i>110</i>
4.11	SENSITIVITÄT WILDTYPISCHER VIREN GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTIVIRALEN STATUS	112
4.11.1	<i>Inhibition der Infektion durch NH₄Cl.....</i>	<i>112</i>
4.11.2	<i>Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status in A549-Zellen</i>	<i>113</i>
5	DISKUSSION	114
5.1	REPLIKATIONSVERHALTEN REKOMBINANTER VIREN IN VERSCHIEDENEN ZELLSYSTEMEN	114
5.2	EINFLUSS DER HUMANEN MUCUSBARRIERE AUF DIE INFEKTION VON IAV	117
5.3	CHARAKTERISIERUNG DES MUCUS	121
5.4	VIRUSSENSITIVITÄT GEGENÜBER DEM IFN-INDUZIERTEN ANTIVIRALEN STATUS ...	123
5.4.1	<i>Fusions-pH abhängige Sensitivität der Infektion während des Zelleintritts</i>	<i>124</i>
5.4.2	<i>Einfluss der Rezeptorbindung auf die Virussensitivität gegenüber IFN während des Zelleintritts</i>	<i>126</i>
5.4.3	<i>Einfluss der Neuraminidase auf die Virussensitivität gegenüber IFN während des Zelleintritts</i>	<i>128</i>
5.4.4	<i>Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status nach mehreren Replikationszyklen.....</i>	<i>129</i>
5.4.5	<i>Virussensitivität gegenüber IFITM-Proteinen</i>	<i>129</i>
6	LITERATURVERZEICHNIS	I
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	XVIII
8	ANHANG	XV
8.1	VIRUSTITER	XV
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XVI
8.3	AMINOSÄUREABKÜRZUNGEN.....	XIX
8.4	PUBLIKATIONEN	XX
8.5	PRÄSENTATIONEN	XX
8.6	LISTE AKADEMISCHER LEHRER.....	XXI
8.7	DANKSAGUNG	XXII

Summary

Influenza A viruses (IAV) originating from birds can cause severe disease in humans. Among the several subtypes transmitted to humans, subtypes H5N1 and H7N9 are of particular interest as they caused outbreaks in humans with high mortality rates. These viruses continue to occasionally transmit from birds to humans representing a pandemic risk. During infection IAV have to overcome host-specific cellular defence mechanisms of the innate immunity, which are not fully defined. In this work, we wanted to investigate interaction of IAV with two factors of innate immunity, namely, airway mucus and IFN-induced antiviral proteins.

In humans, IAV replicate in the respiratory epithelium of airways. Airway epithelium is covered by the so-called mucous blanket. Mucins, highly glycosylated sialylglycoproteins, are the major component of this blanket. They serve as decoy receptors for many pathogens, including viruses. It is generally believed, that human mucins mainly express α 2-3-linked sialic acids and that avian viruses are more sensitive to neutralization by mucus than human viruses (Couceiro et al., 1993). However, more recent reports show higher sensitivity of human viruses to neutralization by mucus than avian viruses.

In the first part of this thesis, we wanted to address this discrepancy and study inhibitory function of mucus secretions from human tracheo-bronchial epithelial (HTBE)-cultures. We found that inhibition depends on the cell system used. In standard laboratory MDCK cells human seasonal virus showed high sensitivity to mucus while infection of avian virus was not inhibited. However, in HTBE-cultures human and avian virus showed comparable sensitivity to mucus. The finding that avian and human viruses bound to mucus to similar extend supported our data. To identify the inhibitory components in mucus we investigated properties of mucus samples. Our data show that mucus samples express α 2-6- and α 2-3-linked sialic acids and that inhibition of influenza infection is dependent on sialic acids in mucus. In summary, we show that avian and human viruses are inhibited by human bronchial mucus which contradicts the general hypothesis that avian viruses are more sensitive to mucus than human viruses.

In the second part, we investigated properties of HA and NA affecting virus sensitivity to the IFN- β -induced antiviral state by constructing recombinant viruses with HA and NA of representative avian, zoonotic and human influenza viruses and internal genes of the lab strain A/Puerto Rico/8/1934. IFN- β is secreted during initial phase of virus infection and induces expression of several hundred so-called interferon-stimulated genes (ISGs). These proteins can have antiviral activity like the interferon induced transmembrane protein family (IFITM), which inhibits viral fusion.

Virus sensitivity to the antiviral state correlated with the pH-optimum of fusion. Viruses with high pH-optimum of fusion, like viruses containing HA and NA of the zoonotic viruses H5N1 or H7N9, infected IFN- β -stimulated cells more efficiently than viruses with low pH-optimum of

fusion. These findings were confirmed by testing recombinant mutant viruses with single point mutations in the HA of A/Hong Kong/1/1968 affecting the pH-optimum of fusion.

Concordant with the data from recombinant viruses, wildtype isolates of H5N1, H7N9 and pandemic virus from 2009 showed a higher pH-optimum of fusion and lower sensitivity to the antiviral state than pandemic 1968 and seasonal human virus.

IFITM proteins were already described as a potent inhibitor of influenza virus fusion. We show that inhibition of viruses by IFITM proteins is dependent on the pH-optimum of viral-induced fusion. Viruses with a high pH-optimum of fusion, such as H5N1 and H7N9, showed lower restriction in MDCK cells stably expressing human IFITM2 and IFITM3 than viruses with a low pH-optimum of fusion.

Our results demonstrate for the first time that the pH-optimum of fusion affects virus sensitivity to IFN-induced effector molecules, including IFITM. These data imply that the high pH-optimum of fusion of zoonotic viruses, such as H5N1 and H7N9, may contribute to their ability to infect and cause severe disease in humans.

Zusammenfassung

Aus Vögeln stammende Influenza-A-Viren (IAV) können im Menschen einen schweren Krankheitsverlauf verursachen. Unter den diversen Subtypen, die vom Vogel auf den Menschen übertragen werden, sind vor allem die Subtypen H5N1 und H7N9 von besonderem Interesse, da sie für IAV-Ausbrüche mit hohen Mortalitätsraten verantwortlich sind. Diese Viren werden gelegentlich vom Vogel auf den Menschen übertragen und stellen deswegen ein pandemisches Risiko dar. Während der Infektion müssen IAV verschiedene wirtsspezifische Verteidigungsmechanismen der angeborenen Immunantwort überwinden, deren Effekt auf die Infektion durch IAV nicht vollständig bekannt ist. In dieser Arbeit sollte die Interaktion von IAV mit zwei Faktoren der angeborenen Immunantwort näher untersucht werden: die Interaktion von IAV mit humanem Atemwegsmucus und die Interaktion mit IFN-induzierten antiviralen Proteinen.

Im Menschen replizieren IAV im Epithel des Respirationstraktes. Das Epithel ist dabei von einer Mucusschicht bedeckt. Mucine, welche hochgradig glykosilierte sialinsäurehaltige Proteine sind, bilden dabei den Hauptanteil des Mucus aus. Sie dienen als extrazelluläre Rezeptoren für Pathogene, wie zum Beispiel Viren. Im Allgemeinen wird angenommen, dass humane Mucine hauptsächlich α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren exprimieren und dass aviäre Viren sensibler gegenüber der Neutralisation durch Mucus sind als humane Viren (Couceiro et al., 1993). Neuere Studien hingegen zeigen, dass humane Viren sensibler gegenüber Mucus sind als aviäre Viren. Im ersten Teil der Arbeit sollte diese Diskrepanz in der Literatur und der inhibitorische Effekt von Mucus aus humanen tracheo-bronchialen Epithel (HTBE)-Kulturen auf die IAV-Infektion untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition abhängig vom genutzten Zellsystem war. Im Standardzellsystem, MDCK-Zellen, zeigte das humane saisonale Virus eine hohe Sensitivität gegenüber Mucus, während die Infektion aviärer Viren nicht inhibiert wurde. Dahingegen zeigten das aviäre und das humane Virus in HTBE-Kulturen eine vergleichbare Inhibition durch Mucus. Dieses Ergebnis wurde dadurch unterstützt, dass aviäre und humane Viren Mucus im vergleichbaren Ausmaß banden. Um die inhibitorischen Komponenten im Mucus zu identifizieren, wurden die Mucuseigenschaften bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Mucusproben sowohl α 2-6- als auch α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren aufweisen und dass die Inhibition von IAV abhängig von den Sialinsäuren im Mucus ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl aviäre als auch humane Viren durch humanen bronchialen Mucus inhibiert werden. Dies widerspricht der allgemeinen Hypothese, dass aviäre Viren sensibler gegenüber bronchialen Mucus sind als humane Viren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Eigenschaften des HAs und der NA die Virussensitivität gegenüber dem IFN- β -induzierten antiviralen Status beeinflussen. Dafür

wurden rekombinante Viren hergestellt, die das HA und NA repräsentativer aviärer, zoonotischer und humaner Viren sowie die internen Gene des Laborstammes A/Puerto Rico/8/1934 besitzen. IFN- β wird während der initialen Phase einer Virusinfektion sezerniert und induziert die Expression mehrerer hundert sogenannter Interferon-stimulierter Gene (ISGs). Diese Proteine können eine antivirale Aktivität aufweisen wie zum Beispiel die Interferon-induzierte-Transmembran-Protein-Familie (IFITM), welche die Fusion zwischen viralen und zellulären Membranen inhibieren. Der genaue Wirkmechanismus der IFITM-Proteine ist jedoch nicht bekannt.

Die Virussensitivität gegenüber dem antiviralen Status korrelierte mit dem pH-Optimum der Fusion. Viren mit einem hohen pH-Optimum der Fusion, wie zum Beispiel Viren, die das HA und NA der zoonotischen Viren H5N1 und H7N9 besaßen, infizierten mit IFN- β vorstimulierte Zellen effizienter als die Viren mit einem niedrigen pH-Optimum der Fusion. Dieses Ergebnis wurde bestätigt, indem rekombinante Viren getestet wurden, die einzelne Punktmutationen im HA des A/Hong Kong/1/1968 besaßen, die das pH-Optimum der Fusion beeinflussten.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der rekombinanten Viren wiesen die korrespondierenden Wildtypisolate des H5N1-, des H7N9-Virus und des pandemischen Virus von 2009 ein höheres pH-Optimum der Fusion sowie eine geringere Sensitivität gegenüber dem IFN- β -induzierten antiviralen Status auf als das pandemische Virus von 1968 und ein humanes saisonales Virus.

Es wurde bereits beschrieben, dass IFITM-Proteine wirksame Inhibitoren der viralen Fusion sind. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Inhibition von Viren durch IFITM-Proteine abhängig vom pH-Optimum der viralen Fusion ist. Viren mit einem hohem Fusions-pH, wie zum Beispiel H5N1 und H7N9, zeigten eine geringere Reduktion der Infektion in MDCK-Zellen, welche das humane IFITM2 und IFITM3 stabil exprimierten, als Viren mit einem niedrigen Fusions-pH.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass das pH-Optimum der Fusion die Virussensitivität gegenüber IFN-induzierten Effektormolekülen, inklusive IFITM-Proteine, beeinflusst. Diese Daten deuten des Weiteren darauf hin, dass das hohe pH-Optimum der Fusion zoonotischer Viren, wie zum Beispiel das H5N1- und das H7N9-Virus, zu ihrer Fähigkeit beitragen könnte, den Menschen zu infizieren und schwere Krankheitsverläufe zu verursachen.

1 Einleitung

1.1 Influenza-A-Viren

1.1.1 Taxonomie

Influenza-A-Viren (IAV) gehören zur Familie der Orthomyxoviridae, zu der auch die Influenza-B-, die Influenza-C-Viren, die Thogotoviren und die Isaviren gehören. Sie besitzen ein einzelsträngiges, segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung und sind membranumhüllt (Webster et al. 1992; Cox, Neumann und Donis 2004). Die acht Gensegmente können dabei insgesamt, je nach Strang, für bis zu 18 verschiedene virale Proteine kodieren (s. Tabelle 1.1) (Szewczyk, Bienkowska-Szewczyk und Król 2014).

Die IAV werden weiterhin aufgrund der Antigenität der beiden Oberflächenmoleküle Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen unterteilt. Die Einteilung erfolgt entsprechend der HA- und NA-Nummerierung, z.B. H5N1. Bisher sind 18 HA- und 11 NA-Subtypen bekannt (Tong et al., 2013, 2012). Die vollständige Nomenklatur von IAV beruht auf dem Virustyp (A, B, C), dem Wirt (außer Menschen), dem Land in dem das Virus isoliert wurde, der Isolatnummer und dem Jahr in welchem es isoliert wurde. Zum Beispiel ist das Virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) ein H5N1-Virus mit der Isolatnummer 1203, das aus einem Patienten in Vietnam im Jahr 2004 isoliert wurde.

1.1.2 Verbreitung der Influenza-A-Viren

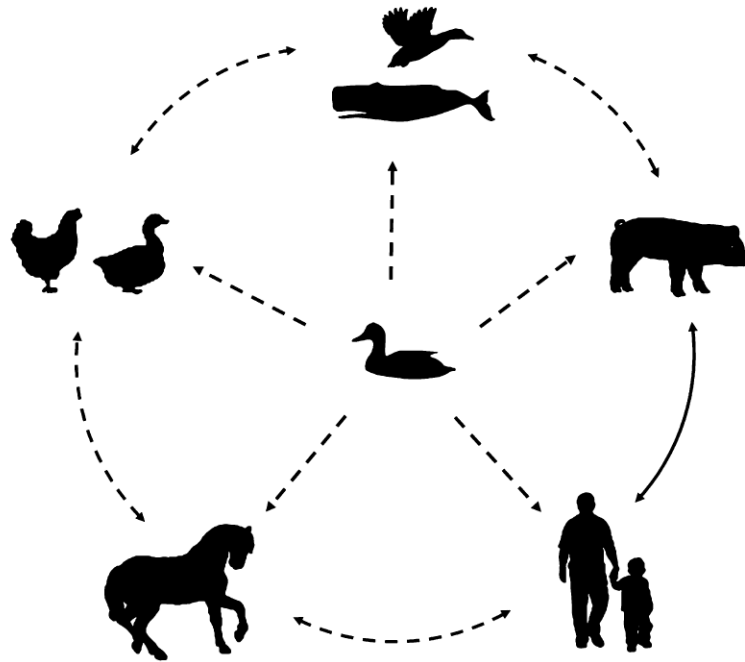


Abbildung 1.1: Wirtsspektrum und Wege der Interspeziestransmission von Influenza-A-Viren
(modifiziert nach Yoon, Webby und Webster 2013)

Das natürliche Wirtsreservoir von IAV sind wildlebende Wasservögel. In ihnen konnten 16 HA und 9 NA-Subtypen nachgewiesen werden (zusammengefasst in Olsen et al., 2006; Webster et al., 1992). Die HA-Subtypen H17 und H18 und die NA-Subtypen N10 und N11 stellen dabei Ausnahmen dar, da sie ausschließlich in Fledermäusen nachgewiesen wurden und bisher kein Virus mit diesen HA- und NA-Subtypen isoliert werden konnte (zusammengefasst in Yoon et al., 2013). Von wildlebenden Wasservögeln können IAV auf andere aviäre Spezies, wie domestiziertes Geflügel, oder Säugerspezies, wie das Schwein oder den Menschen, übertragen werden (s. Abb. 1.1) (zusammengefasst in Short et al., 2015). IAV können durch engen Kontakt mit aviären Spezies oder anderen Säuger-Spezies vom Tier auf den Menschen übertragen werden (Yoon, Webby und Webster 2013; Short et al. 2015).

In den verschiedenen Spezies zirkulieren unterschiedliche IAV-Subtypen. So zirkulieren im Menschen nur IAV der Subtypen H1 und H3 (zusammengefasst in Hay et al., 2001). IAV des H2-Subtyps zirkulierten zwischen 1957 und 1968 und wurden 1968 durch die Asiatische Grippe des Subtyps H3N2 verdrängt (zusammengefasst in Cox & Subbarao, 2000 und Webster et al., 1992). Eine Übertragung anderer Subtypen, wie z.B. H5 und H7, auf den Menschen ist ebenfalls möglich (Easterday und Couch 1975; Webster et al. 1992; Röhm et al. 1996). Im Gegensatz zu den pandemischen und saisonalen Viren sind diese Subtypen nicht in der Lage effizient zwischen Menschen zu zirkulieren (Peiris et al., 2004; Subbarao et al., 1998).

1.2 Morphologie und Genetik

1.2.1 Morphologie

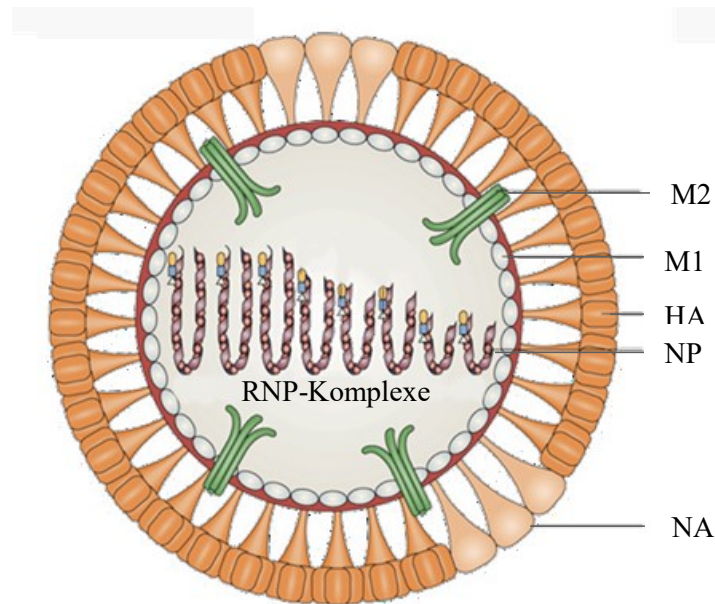


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines Influenza-A-Virus (modifiziert nach Subbarao & Joseph, 2007).

IAV sind von pleomorpher Gestalt mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm. Es sind umhüllte Viren in deren Membran die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie der Protonenkanal M2 eingelagert sind (s. Abb. 1.2) (zusammengefasst in Webster et al., 1992). Dabei liegt das HA als Homotrimer und die NA als Homotetramer in der Membran vor. Die Membran wird durch eine Doppellipidschicht gebildet, die ihren Ursprung in der Wirtszellemembran hat und bei der Virusabknospung entsteht. Die Membran wird von innen durch das Matrixprotein M1 ausgekleidet (s. Abb. 1.2). Assoziiert mit dem M1-Protein befinden sich im Virusinneren acht Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) (zusammengefasst in Webster et al., 1992). Die RNPs bestehen aus je einem Genesegment einzelsträngiger viraler RNA in negativer Orientierung, welches vom Nukleokapsidprotein (NP) umhüllt ist. Dabei bilden sie eine doppel-helikale Struktur aus (Zheng und Tao 2013). Da das 3'- und das 5'-Ende der viralen RNA komplementär zueinander sind, bilden die beiden Enden eine partiell doppelsträngige RNA. An dieses Ende der RNA ist der Polymerasekomplex, bestehend aus den drei Polymeraseproteinen PB1 (*polymerase basic protein 1*), PB2 (*polymerase basic protein 2*) und PA (*polymerase acid protein*), gebunden (Noda und Kawaoka 2010).

1.2.2 Genomaufbau und kodierte Proteine

Das Genom der IAV besteht aus acht Gensegmenten einzelsträngiger RNA in negativer Orientierung (zusammengefasst in Webster et al., 1992). Die Gensegmente 1, 4, 5 und 6 kodieren für je ein virales Protein, während die anderen Gensegmente für mehrere virale Proteine kodieren können. Gensegment 1 kodiert für das Protein PB2, welches im viralen Replikationszyklus für die *Cap*-Bindung verantwortlich ist. Gensegment 2 kann neben dem PB1-Protein, welches die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase einnimmt, weiterhin für die beiden Proteine PB1-F2 (Chen et al., 2010) und das N40-Protein kodieren (Wise et al., 2009). Das Gensegment 3 kann wiederum für das Polymerase-Protein PA sowie für das PA-X Protein kodieren (Jagger et al., 2012). Das PA besitzt eine Endonukleaseaktivität, die für das Abspalten der 5′-Caps von zellulären mRNAs zuständig ist. Zusätzlich können auf dem Gensegment 3 noch die Nukleotidsequenzen für die Proteine PA-N155 und PA-N182 kodiert sein (Vasin et al., 2014).

Das Segment 4 kodiert für das Glykoprotein HA, das Segment 5 für das Nukleokapsidprotein NP. Gensegment 6 wiederum kodiert für die NA, ebenfalls ein Glykoprotein. Die Segmente sieben und acht kodieren für jeweils zwei Proteine, M1 und M2 bzw. NS1 und NS2, die durch alternatives Spleißen entstehen (Webster et al., 1992). Auf diesen Segmenten können zusätzlich noch die Proteine M42 und NS3 kodiert sein (zusammengefasst in Vasin et al., 2014). Die Anzahl viraler Proteine variiert dabei abhängig vom Virusisolat. Insgesamt konnten bisher 18 verschiedene Virusproteine nachgewiesen werden (zusammengefasst in Szewczyk, Bienkowska-Szewczyk und Król 2014).

Die bekannten Funktionen, die Segmentlokalisation und die Größe der einzelnen Proteine sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Genesegment, Größe und Funktion der Influenza-A-Proteine des Virus A/Anhui/1/2013
(zusammengefasst in Cox, Neumann und Donis, 2004 und Vasin et al., 2014).

Gensegment	Proteinname	Proteingröße (AS)	Funktion
1	PB2	759	<i>Cap</i> -Bindung Initiation der Transkription
	PB1	757	RNA-abhängige RNA-Polymerase Teil des Polymerasekomplexes
2	PB1-F2	90	Virulenzfaktor Induktion Mitochondrien-assoziiierter Apoptose
	PB1-N40	718	Balanciert die Expression zwischen PB1 und PB1-F2
3	PA	716	Endonukleaseaktivität <i>Cap-Snatching</i>
	PA-X	252	Vermittelt den Wirtszell- <i>Shutoff</i> um die antivirale Antwort zu vermindern
	PA-N155		Funktion nicht bekannt
	PA-N182		Funktion nicht bekannt
4	HA	550	Rezeptorbindung pH-induzierte Fusion im Endosom
5	NP	498	Enkapsidiert das RNA-Genom Transport der RNPs in den Kern
	eNP		Funktion nicht bekannt
6	NA	454	Sialidaseaktivität Aviäre NAs: HAD-Domäne
7	M1	252	Matrixprotein Involviert in Export viraler RNPs an Membran
	M2	97	Protonenkanal (Ansäuerung des Virusinneren)
	M42		Trunkierte Version von M2; Protonenkanal
8	NS1	230	Interferon-Antagonist Bindung viraler RNA
	NS2	121	Nuklearer Export der RNP-Komplexe Pathogenitätsfaktor
	NS3		Adaption an Maus Funktion nicht bekannt

1.3 Replikationszyklus

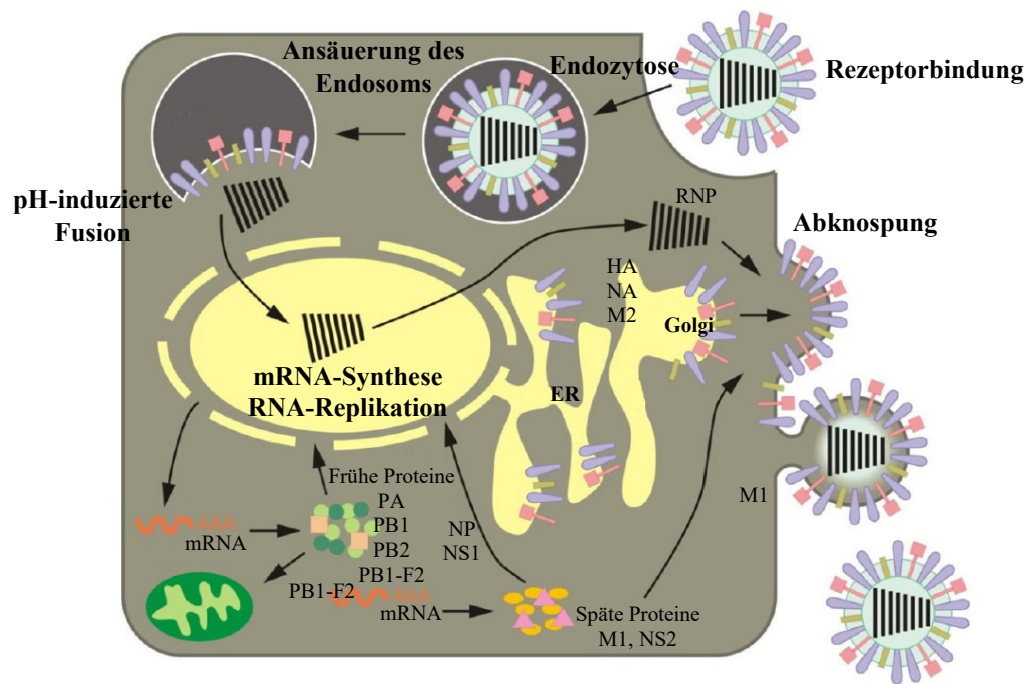


Abbildung 1.3: Replikationszyklus eines Influenza-A-Virus (modifiziert nach Neumann et al., 2009).

IAV binden über das HA an terminale Sialinsäuren, die auf Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Hauptsächlich gelangen IAV mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle, wobei auch beschrieben wurde, dass mittels Makropinozytose die Zelle durch IAV infiziert werden kann (de Vries et al., 2011). Die IAV liegen zunächst im Endosom vor, welches während seiner Reifung zum Lysosom angesäuert wird. Durch die Ansäuerung des Endosoms kommt es zur Konformationsänderung im HA, welche zur Fusion der viralen mit der endosomalen Membran führt (s. 1.4.2) (zusammengefasst in Skehel und Wiley, 2000). Im Zuge der Ansäuerung werden durch das M2-Protein Protonen in das Virusinnere geleitet, was zur Dissoziation der RNP-Komplexe vom M1-Protein führt. Nach erfolgter Fusion werden die RNPs ins Zytoplasma entlassen. Sie werden mit Hilfe von zellulären Importinen in den Nukleus transportiert, wo die mRNA-Synthese durch den viralen Polymerasekomplex initiiert wird. PB1 synthetisiert einen zur viralen RNA komplementären Strang, der zum einen als Vorläufer-mRNA, zum anderen als *Template* für die Herstellung neuer viraler RNA dienen kann. Bei der Herstellung viraler mRNA findet das sogenannte *Cap-Snatching* statt. Die zellulären Caps werden durch PB2 gebunden und durch PA von der zellulären mRNA abgespalten. Anschließend werden sie an die virale mRNA angefügt. mRNAs werden aus dem Nukleus ausgeschleust und die viralen Proteine synthetisiert. Dabei werden die Proteine PB1, PB2, PA, NS1, NS2 und NP an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert. Diese Proteine werden anschließend wieder in den Zellkern transportiert. Dort findet neben der mRNA-Synthese auch die Replikation des viralen Genoms

statt. Dabei werden neu synthetisierte RNA-Genome vom NP encapsidiert und es findet die Anlagerung eines Polymerasekomplexes pro RNA-Strang statt. Die so entstandenen RNP-Komplexe werden anschließend, vermittelt durch das NS2- und M1-Protein, an die Zellmembran transportiert (zusammengefasst in Neumann, Noda und Kawaoka, 2009).

Die Proteine HA, NA und M2 werden ins ER translatiert und gelangen über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgiapparat an die Zellmembran. Dabei wird das HA im ER zunächst glykosyliert (*high mannose type*) und im Golgiapparat zu Oligosaccharide des komplexen Typs weiter prozessiert. An der Zellmembran bilden die Proteine HA, NA und M2 zusammen mit dem M1-Protein und den RNP-Komplexen neue Virionen, die von der infizierten Zelle abknospen (zusammengefasst in Cox et al., 2004).

1.4 Hämagglutinin

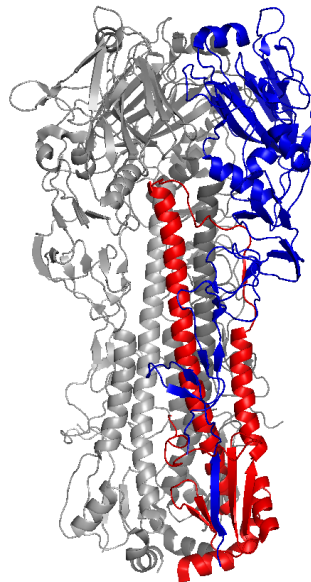


Abbildung 1.4: HA-Trimer von A/Aichi/2/1968 (H3N2). Ein HA-Monomer in blau und rot, verbleibende HA-Monomere in grau. Blau: HA1; rot: HA2 (1HGG, Proteindatenbank).

Das HA ist ein Typ-I Transmembranprotein. Es gibt verschiedene Subtypen, die aufgrund ihrer serologischen Eigenschaften unterschieden werden und sich um mindestens 30 % in ihrer Aminosäuresequenz des HA1 unterscheiden (Webster et al., 1992). Bisher sind 18 HA-Subtypen bekannt, von denen 16 in wildlebenden Wasservögel und zwei ausschließlich in Fledermäusen, H17 und H18, gefunden wurden (Sun et al., 2013; Tong et al., 2013).

Das HA liegt als Homotrimer in der Virusmembran vor (zusammengefasst in Cox et al., 2004; Wiley, Skehel und Waterfield, 1977). Es wird als Vorläuferprotein HA0 im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und anschließend über den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert (zusammengefasst in Skehel und Wiley, 2000).

Amino (N)-terminal befindet sich das Signalpeptid, welches während des Transports des HAs abgespalten wird (zusammengefasst in Veit und Thaa, 2011; Nayak und Jabbar, 1989). Das HA ist über die C-terminale Transmembrandomäne, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, in der Virusmembran verankert (Cox et al., 2004).

Durch Proteasen wird das HA0-Vorläuferprotein in die beiden Untereinheiten HA1 (s. Abb. 1.4 blau) und HA2 (s. Abb. 1.4 rot) gespalten, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Segal et al., 1992). Bei der Spaltung des HA0 wird das Fusionspeptid (s. 1.4.2) freigelegt (zusammengefasst in Skehel und Wiley, 2000). Die Spaltung des HA0 ist essentiell für die Infektiosität der Viren (Garten et al., 1981; Klenk, et al., 1975). Viren, deren HA0 nicht gespalten wurde, können an die Rezeptoren binden und endozytiert werden. Da das Fusionspeptid nicht frei vorliegt, können sie jedoch nicht die Zielzelle infizieren (Klenk et al., 1975; Lazarowitz und Choppin, 1975). Die Spaltung des HAs kann sowohl intrazellulär (Horimoto et al., 1994; Stieneke-Gröber et al., 1992) als auch extrazellulär stattfinden (Klenk et al., 1975). Viren mit nicht gespaltenem HA0 können auch vor der Infektion der Zielzellen durch auf der Zielzelle exprimierte Proteasen gespalten werden (Garten et al., 2015; Boycott, Klenk und Ohuchi, 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass bakterielle Proteasen in der Lage sind das HA von IAV zu aktivieren (Tashiro et al., 1987).

Aufgrund der Aminosäuresequenz der Spaltstelle und somit aufgrund der damit verbundenen Sensitivität gegenüber Wirtsproteasen werden aviäre IAV in hochpathogene aviäre Influenza Viren (HPAI) und niedrigpathogene aviäre Influenza Viren (LPAI) eingeteilt (zusammengefasst in Alexander, 2000). HPAI besitzen ein HA mit einer multibasischen Spaltstelle. Die Aminosäuresequenz der multibasischen Spaltstelle ist R-X-R/K-R und wird durch ubiquitär exprimierte Subtilin-ähnliche zelluläre Proteasen gespalten (Stieneke-Gröber et al., 1992). Durch die ubiquitäre Expression der Proteasen kann das HA dieser IAV in jedem Gewebe aktiviert werden und somit zu systemischen Infektionen führen (zusammengefasst in Alexander, 2000; Rott, 1992).

LPAI hingegen besitzen an der Spaltstelle ein einzelnes Arginin, ein monobasisches Spaltnotiv (Garten et al., 1981). Diese HAs können nur durch Trypsin-ähnliche Proteasen gespalten werden, die in einzelnen Geweben exprimiert werden und somit die Infektion lokal begrenzen (zusammengefasst in Alexander, 2000). HAs mit monobasischer Spaltstelle können durch Proteasen wie Trypsin (Klenk et al., 1975), HAT oder TMPRSS2 gespalten werden (Böttcher et al., 2006).

Das HA1 bildet die globulären Kopffdomäne des HA-Trimers, welche aus mehreren β -Faltblättern besteht und vermittelt die Rezeptorbindung durch die in ihm enthaltene Rezeptorbindungsdomäne (s. Abb. 1.4) (zusammengefasst in Skehel und Wiley, 2000).

Das HA2 bildet die Stiel-Domäne des HAs (s. Abb. 1.4) und verankert das HA-Molekül über eine Transmembrandomäne in der Virusmembran. Es besteht aus mehreren Helices, welche im

Verlauf der pH-induzierten Fusion von entscheidender Bedeutung sind (s. 1.4.2) (Skehel und Wiley, 2000).

An das HA2 ist das Fusions-Peptid, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, gebunden (Stevens et al., 2004; Xu und Wilson, 2011).

1.4.1 Rezeptorbindung und Rezeptorspezifität

Die Rezeptoren von IAV sind endständige Sialinsäuren, die an Zuckerketten auf Glykolipiden und Glykoproteinen auf der Zelloberfläche gebunden sind (Rogers und Paulson, 1983). Man unterscheidet im Allgemeinen zwei Rezeptortypen: den humanen und den aviären Rezeptortyp. Der humane Rezeptortyp besitzt eine α 2-6-Verknüpfung zwischen der Sialinsäure (Neu5Ac) und dem nächsten Zucker (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc), wohingegen es beim aviären Rezeptortypen eine α 2-3-Verknüpfung ist (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, s. Abb. 1.5) (Connor et al., 1994).

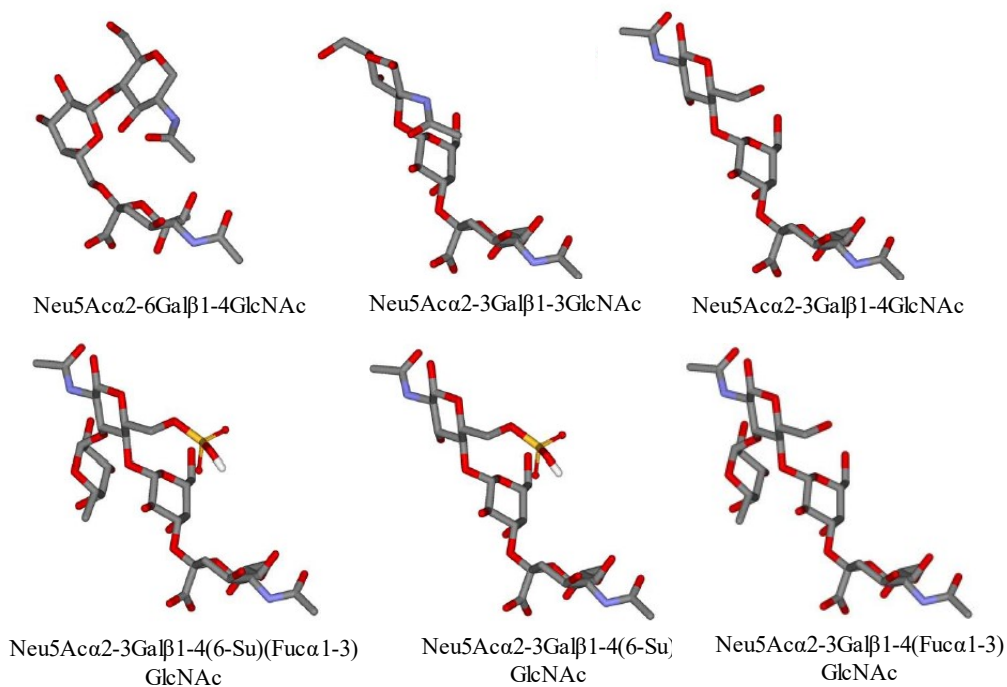


Abbildung 1.5: Struktur der Influenza-Rezeptoren (modifiziert nach A. S. Gambaryan et al., 2008).

Viren, die an den Menschen und das Schwein adaptiert sind, binden α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren während aviäre Viren α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren binden (Matrosovich et al., 1997; Rogers und Paulson, 1983). Jedoch können auch Viren mit aviärer Rezeptorspezifität im Menschen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel das H5N1 Virus A/Vietnam/1203/2004 (Ramos et al.,

2011). Es gibt auch Beispiele, bei denen ein Virusisolat den aviären und den humanen Rezeptortypen binden kann (Ramos et al., 2013; Rogers und D'Souza, 1989).

Neben der Verknüpfung der terminalen Sialinsäuren wird die Bindung aviärer IAV durch die Verknüpfung der darauffolgenden Zuckerreste als auch durch Seitengruppen der Glykane beeinflusst (Gambaryan et al., 2005). Viren aus Enten binden an α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren mit einer β 1-3-Verknüpfung zwischen dem zweiten und dem dritten Zucker (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc) (s. Abb. 1.5). Viren aus Möwen binden präferenziell an α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren mit einer Fucosegruppe und einer β 1-4-Verknüpfung zwischen dem zweiten und dem dritten Zucker (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) (s. Abb. 1.5). Viren aus domestiziertem Geflügel mit den Subtypen H5, H7 und H9 binden an sulfatierte Rezeptoren mit einer α 2-3- und einer β 1-4-Verknüpfung (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(6-Su)GlcNAc) (s. Abb. 1.5). Zusätzlich dazu können einige Vertreter der HA-Subtypen H5, H7 und H9 auch den humanen Rezeptortyp binden (Gambaryan et al., 2006).

Im menschlichen Respirationstrakt kommt hauptsächlich der humane Rezeptortyp vor (Klenk et al., 2011). Dabei sind in den oberen Atemwegen mehr α 2-6- als α 2-3-Sialinsäuren vorhanden (Matrosovich et al., 2004b). In den unteren Atemwegen sind die Rezeptoren gleich verteilt. Erst in den Alveoli kommen α 2-3 Sialinsäuren in signifikanten Mengen vor (Shinya et al., 2006).

Bei allen pandemischen Viren konnte ein Wechsel in der Rezeptorspezifität von α 2-3- zu α 2-6-Sialinsäuren beobachtet werden. Deswegen nimmt man an, dass eine Änderung der Rezeptorspezifität von aviär auf human ein entscheidender Faktor bei der Adaption aviärer Viren an den Menschen ist (de Graaf und Fouchier, 2014; Neumann und Kawaoka, 2015a; Paulson und de Vries, 2013).

In aviären Spezies kommen sowohl α 2-3- als auch α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren als potentielle Rezeptoren für IAV vor. Dabei ist die Expression α 2-3-verknüpfter Sialinsäuren in Vögeln deutlich stärker ausgeprägt als die Expression α 2-6-verknüpfter Sialinsäuren (Costa et al., 2012). Die Rezeptoren sind sowohl im Respirationstrakt als auch im Gastrointestinaltrakt (GIT) von Vögeln vorhanden. Die Replikation von IAV in wildlebenden Wasservögeln findet im Gastrointestinaltrakt (GIT) statt (Webster et al., 1992).

Schweine weisen im Respirationstrakt α 2-3- und α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren auf (Ito et al., 1998; Y. Suzuki et al., 2000). Ähnlich wie beim Menschen treten jedoch in den unteren Atemwegen mehr α 2-3 Sialinsäuren auf. Schweine gelten als potentielle Mischgefäße für die Entstehung neuer humaner Viren (Neumann, Noda und Kawaoka, 2009; Trebbien, Larsen und Viuff, 2011; Wu et al., 2014). Aviäre Viren infizieren Schweine und können sich in ihnen an Säuger adaptieren, zum Beispiel durch Änderung der Rezeptorspezifität. Zusätzlich dazu - aufgrund der Tatsache, dass Schweine durch humane, porcine und aviäre Viren infiziert werden können - kann es zu Reassortierungsereignissen zwischen aviären, porcinen und humanen Viren im Schwein kommen (Scholtissek, Ludwig und Fitch, 1993). Reassortierung beschreibt den

Austausch eines oder mehrerer viraler Gene zwischen mehreren IAV (s. 1.6). Reassortierungsereignisse zwischen porzinen und humanen Viren konnten schon nachgewiesen werden (Zhu et al., 2011), so entstand das pandemische Virus von 2009 durch Reassortierungsereignisse im Schwein (Garten et al., 2009).

Der primäre Replikationsort von IAV im Menschen ist das tracheo-bronchiale Epithel des Respirationstraktes. Dieses Epithel besteht aus verschiedenen Zelltypen, wie Mucus-produzierende Becherzellen, ziliert tragende Zellen, basale Zellen. Auch subepitheliale Drüsen sind vorhanden (zusammengefasst in Rose, 2006). Die Rezeptorspezifität beeinflusst den Zelltropismus der IAV. So konnte in ausdifferenzierten Zellen des tracheo-bronchialen Epithels (HTBE-Kulturen) gezeigt werden, dass Viren mit rein aviärer Rezeptorspezifität ausschließlich zilierte Zellen infizierten, während humane Viren sowohl zilierte als auch nicht zilierte Zellen infizierten (Matrosovich et al., 2004b). Es wird vermutet, dass die Affinität für $\alpha 2$ -3-verknüpfte Sialinsäuren, welche in signifikanten Mengen in den Alveoli vorkommen, mit verantwortlich ist für eine erhöhte Pathogenität aviärer Viren im Menschen. Diese Vermutung beruht dabei auf der Tatsache, dass aviäre Viren in den Alveoli replizieren und eine erhöhte Pathogenität aufweisen (Wit et al., 2008).

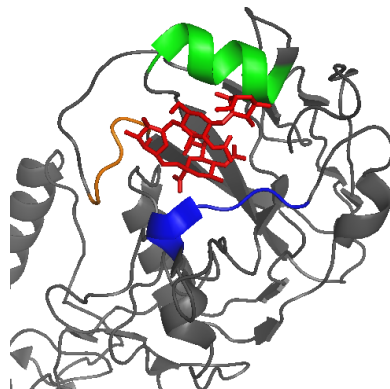


Abbildung 1.6: Bindung des humanen Rezeptors im H2-Monomer von A/Singapore/1/1957. Grün: 190-Helix; blau: 130er-Schleife; orange: 220er-Schleife; rot: humaner Rezeptor, grau: verbleibende HA-Strukturen (1WR7, Proteindatenbank) (J. Liu et al., 2009).

Die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) liegt auf der Spitze des HA1 (s. Abb. 1.6). Die Rezeptorbindungsdomäne wird durch drei Gruppen von Aminosäuren bestimmt: der 130er-Schleife (s. Abb. 1.6 blau), der 220er-Schleife (s. Abb. 1.6 orange) und der 190er-Helix (s. Abb. 1.6 grün) (Skehel und Wiley, 2000; Weis et al., 1988; Wilson, Skehel und Wiley, 1981). Der Boden der Rezeptorbindungstasche wird durch die konservierten Aminosäuren Y98, W153, H183 und Y195 definiert (zusammengefasst in Gamblin und Skehel, 2010; Skehel und Wiley, 2000). Mutationen in diesen erwähnten Strukturen können zum einen die Rezeptorspezifität und zum anderen die Bindungsstärke des HAs an den Rezeptor verändern. Die bekanntesten Mutationen,

die die Rezeptorspezifität beeinflussen, sind L226Q und S228G. Die Rezeptorspezifität ändert sich in dem Fall von $\alpha 2$ -3, aviär, zu $\alpha 2$ -6, human (Daniels et al., 1987).

Wie zuvor erwähnt können IAV aus domestiziertem Geflügel sulfatierte Rezeptoren binden. Für diese Bindung ist Position 193 in der Rezeptorbindungsdomäne verantwortlich. Diese Position interagiert bei sulfatierten Rezeptoren mit einer $\beta 1$ -4-Verknüpfung zwischen dem zweiten und dem dritten Zucker mit deren Sulfatgruppe. Positiv geladene Aminosäuren wie Lysin können über elektrostatische Anziehung direkt mit der negativ geladenen Sulfatgruppe interagieren (Gambaryan et al., 2012).

Für die Bindung von fucosylierten Rezeptoren ist die Position 222 relevant. Durch die räumliche Nähe der Fucosegruppe $\alpha 2$ -3 $\beta 1$ -4-verknüpfter Rezeptoren, kann ein Lysin an Position 222 Wasserstoffbrückenbindungen mit der Fucose ausbilden (Gambaryan et al., 2005). Im Falle der Pandemie von 2009 wiesen Isolate aus tödlich verlaufenden Fällen vermehrt die Mutation D222G im HA auf. Die 222G-Variante des pandemischen Virus hatte eine erhöhte Affinität zu $\alpha 2$ -3-verknüpften Sialinsäuren und eine erhöhte Bindung an Typ II-Pneumozyten, zilierte Zellen und alveolare Makrophagen zur Folge (Chutinimitkul et al., 2010; Y. Liu et al., 2010).

1.4.2 pH-induzierte HA-vermittelte Fusion

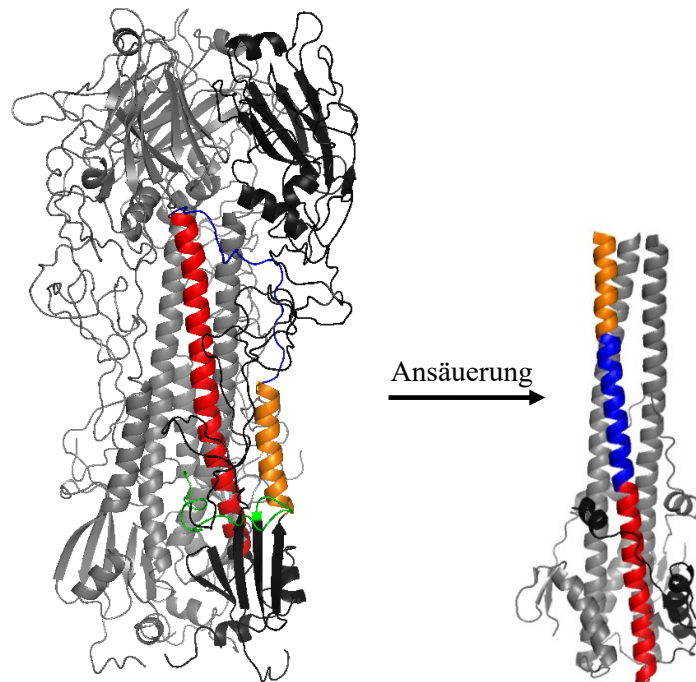


Abbildung 1.7: Struktur des HA-Trimers von A/Aichi/2/1968 (H3N2) vor (links) und nach (rechts) der Fusion. Schwarz: HA1; grün: Fusionspeptid; rot: A-Helix; blau: B-Schleife (links)/B-Helix (rechts); orange: C-Helix; grau: zwei HA-Monomere (1HGG und 1HTM, Proteindatenbank).

Die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran ist ein essentieller Schritt im Replikationszyklus von IAV. Durch die Fusion werden die RNP-Komplexe in das Zytoplasma freigesetzt und anschließend zum Nukleus transportiert, wo die Transkription und die Replikation der viralen RNA stattfinden (zusammengefasst in Webster et al., 1992). Die Fusion wird durch das Fusionspeptid im HA2 vermittelt (s. Abb. 1.7 grün). Im HA2 knüpft eine große α -Helix (A-Helix) an die Transmembrandomäne (TMD) an (s. Abb. 1.7, rot). In einem HA-Trimer bilden die drei A-Helices eine *Coiled-coil* Struktur aus (s. Abb. 1.7) (Wilson, Skehel und Wiley, 1981; Stevens et al., 2004). Die A-Helix ist über die B-Schleife (*Loop*) (s. Abb. 1.7, blau) mit der C-Helix verbunden (s. Abb. 1.7, orange) (Ha et al., 2002).

Das Fusionspeptid liegt nach erfolgter Spaltung des HA0 N-terminal im HA2 vor (s. Abb. 1.7 grün). Dabei ist es hoch konserviert bei verschiedenen HA-Subtypen. Es besteht aus den 23 N-terminalen, meist hydrophoben, Aminosäuren im HA2 (Cross et al., 2009). Die Struktur des Fusionspeptids in der Zielmembran konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlich liegt es jedoch als α -Helix bei der Fusion vor (Skehel et al., 2001).

Nach erfolgter Endozytose wird bei der Reifung des Endosoms vom frühen über das späte Endosom zum Lysosom das Endosomeninnere angesäuert. Das HA1 wird protoniert und diese Protonierung führt zur Dissoziation der HA1-Moleküle voneinander sowie zur Ablösung des HA1

vom Rezeptor (Huang et al., 2002; Böttcher et al., 1999). Diese Konformationsänderung erlaubt es H₂O-Molekülen, in die Ektodomäne des HAS einzudringen und mit dem HA zu interagieren. Die H₂O-Moleküle interagieren mit der B-Schleife im HA2 und diese durchläuft dadurch eine *Loop-to-Helix-Transition* (Carr, Chaudhry und Kim, 1997; Carr und Kim, 1993). Dies führt dazu, dass das HA2 eine verlängerte *Coiled-coil* Konformation einnimmt, die zur Einlagerung des Fusions-Peptids in die Endosomenmembran führt (s. Abb. 1.7) (Carr et al., 1997).

Durch eine strukturelle Änderung in der A-Helix an den Positionen 106-112 kollabiert die verlängerte *Coiled-coil* Konformation (Wilson, Skehel und Wiley, 1981; Bullough et al., 1994). Dadurch kommt das in der Zielmembran integrierte Fusionspeptid in die Nähe der Transmembranregion des HAS in der Virusmembran (Durrer et al., 1996; Chen, Skehel und Wiley, 1999). In Folge kommen auch die virale und die endosomale Membran in räumliche Nähe. Zunächst fusionieren dabei die jeweils äußeren Lipidschichten der Doppellipidmembranen. Diesen Vorgang nennt man Hemifusion. Anschließend mischen sich auch die Lipide aus den anderen Lipidschichten der Membranen und eine Fusionspore entsteht (Borrego-Diaz et al., 2003; Park, Gruenke und White, 2003). Die Fusionspore wird dabei durch die Konformationsänderung weiterer HA-Moleküle am Rand der Pore vergrößert (Leikina et al., 2004).

Der pH, bei dem die Fusion induziert wird, kann zwischen einzelnen Viren variieren. Pandemische Viren, humane saisonale Viren und Viren aus wildlebenden Wasservögeln haben einen niedrigen Fusions-pH von 5,0-5,2. Man nimmt deswegen an, dass diese Viren im späten Endosom fusionieren (Okamatsu et al., 2016; Galloway et al., 2013). Viren aus Schweinen und domestiziertem Geflügel fusionieren hingegen bei einem höheren pH von bis zu 6 (Baumann et al., 2015; Okamatsu et al., 2016).

Bisher konnten über 70 Aminosäuren im HA detektiert werden, die einen Einfluss auf den Fusions-pH haben können (zusammengefasst in Russell, 2014). Diese Aminosäurereste haben sowohl einen Einfluss auf die Sekundär- als auch die Tertiärstruktur des HAS und beeinflussen somit den Fusions-pH.

1.4.3 Stabilität und Transmission

Die Stabilität von IAV gegenüber niedrigem pH ist ein wichtiger Faktor bei der Virusadaption an neue Spezies. Dabei korreliert die Stabilität der IAV mit dem Fusions-pH des HA. Viren mit einem niedrigen Fusions-pH weisen eine höhere Stabilität auf als Viren mit hohem Fusions-pH (Costello, Whittaker und Daniel, 2015; Mair et al., 2014; Russell, 2014; Skehel und Wiley, 2000; Baumann et al., 2015).

Die pH-Stabilität ist abhängig vom Virus-Strang und der Spezies, aus der das Virus isoliert wurde (Scholtissek, 1985; Costello, Whittaker und Daniel, 2015). So konnte gezeigt werden, dass Viren aus wildlebenden Wasservögeln und Menschen eine höhere Stabilität aufwiesen als Viren, die

aus Schweinen oder domestiziertem Geflügel isoliert wurden (Baumann et al., 2015; Russier et al., 2016; Scholtissek, 1985; Costello, Whittaker und Daniel, 2015).

Instabile aviäre Viren werden durch enge räumliche Nähe vom Vogel auf den Menschen übertragen (Chen et al., 2013; WHO, 2016b). Dabei scheint die Massentierhaltung eine entscheidende Rolle zu spielen, da sich in diesen Ställen IAV mit instabilen HAs etablieren konnten und persistieren (Leibler et al., 2009; Harder et al., 2009).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HPAI-Viren eine geringere Stabilität aufweisen als LPAI-Viren (DuBois et al., 2011). Es ist jedoch anzumerken, dass das Virus des H7N9-Ausbruchs von 2013 ebenfalls eine geringe Stabilität aufweist, obwohl es zu den LPAI gezählt wird (Belser et al., 2013). Im Falle eines HPAI H5N1-Virus wurde gezeigt, dass eine stabilisierende Mutation im HA zu einer Attenuierung der Replikation und erhöhten Übertragbarkeit in Enten führte (Reed et al., 2010). In Hühnern beeinflusst die pH-Stabilität von H5-Viren ebenfalls die Pathogenität. Viren mit einer geringen Stabilität sind pathogener als Viren mit einer hohen Stabilität (DuBois et al., 2011).

Neuere Studien weisen darauf hin, dass die pH-Stabilität der Viren einen Einfluss auf die Transmissionsroute haben könnte. Während der Adaptation eines H5N1-Virus an das Frettchen traten neben Adaptionen in der RBD, die die Rezeptorspezifität von $\alpha 2-3$ auf $\alpha 2-6$ änderten, auch HA-stabilisierende Adaptionen auf (Imai et al., 2012; Linster et al., 2014). Diese Viren waren in der Lage Frettchen via Aerosole zu infizieren. Weitere Studien zeigten, dass die stabilisierenden Mutationen nicht allein ausreichend sind, um den H5N1-Subtyp im Frettchenmodell per Luft übertragbar zu machen, sondern auch der Wechsel in der Rezeptorspezifität notwendig ist (Shelton et al., 2013; Zaraket et al., 2013). Bei dem pandemischen Virus von 2009 konnte beobachtet werden, dass Isolate aus der frühen Phase der Pandemie eine niedrigere Stabilität als Isolate aus der späten Phase der Pandemie aufweisen (Russier et al., 2016). Dies ist ein Hinweis darauf, dass humane Viren sich in Richtung eines stabilen HA entwickeln.

Enten-Viren weisen eine hohe Stabilität auf (Baumann et al., 2015; Russier et al., 2016). Da die Transmission zwischen Enten über die fäkal-orale Route verläuft vermutet man, dass eine erhöhte Stabilität der IAV die Transmission über das Wasser erleichtert und eine schnelle Inaktivierung der Viren verhindert. So können stabile Viren im Wasser länger infektiös bleiben (Reed et al., 2010).

1.5 Neuraminidase

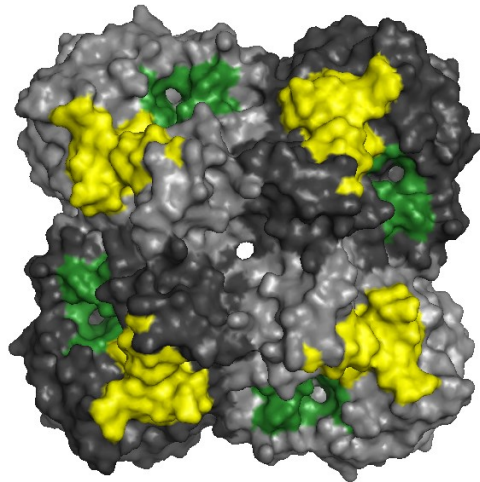


Abbildung 1.8: Aufsicht auf die enzymatische Domäne (ED) und die Hämadsorptionsdomäne (HAD) gezeigt anhand des Modells des N2-Tetramer von A/Tokyo/3/1967. Grau und schwarz: NA-Monomere; gelb: HAD, grün: enzymatische Domäne (Struktur 3TIA aus Proteindatenbank).

Die Neuraminidase (NA) ist neben dem HA das zweite Glykoprotein der IAV. Sie ist ein Typ II-Transmembranprotein (Webster et al., 1992). Es gibt bislang 11 bekannte NA-Subtypen, wovon die Subtypen 1-9 in wildlebenden Wasservögeln und die Subtypen 10 und 11 in Fledermäusen nachgewiesen wurden (Wu et al., 2014). Die NA liegt in der Virusmembran als Homotetramer vor und bildet pilzförmige Strukturen aus (Colman, 1994).

Die NA besitzt eine zytoplasmatischen Domäne, eine Transmembrandomäne (TMD), eine Stiel-Domäne und eine Kopfdomäne in der die enzymatische Domäne (ED) vorliegen (Laver et al., 1984). Aviäre Viren besitzen zusätzlich eine Hämabsorptionsdomäne (HAD) (Uhlendorff et al., 2009).

Die zytoplasmatische Domäne der NA liegt N-terminal im Protein und ist sechs Aminosäuren lang. Diese sechs Aminosäuren sind in allen Subtypen hoch konserviert (Blok und Air, 1982; Blok et al., 1982). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Deletion der zytoplasmatischen Domäne filamentöse Influenza-Partikel entstehen (Jin et al., 1997). Daraus lässt sich schließen, dass diese Domäne einen Einfluss auf die Virusbildung und die Abknospung neuer Viren hat. Weiterhin wurde gezeigt, dass Mutationen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne zur Bildung infektiöser Viruspartikel führen, die jedoch eine verringerte Fitness aufweisen (Barman et al., 2004).

Die TMD der NA besteht aus hydrophoben Aminosäuren und weist einige zwischen den einzelnen Subtypen konservierte Bereiche auf. Die konservierten Bereiche liegen zwischen den Aminosäuren 7 bis 14 am N-Terminus und den Aminosäuren 22 bis 28 am Carboxy (C)-Terminus der TMD. Die TMD ist für die Verankerung der NA in der Virusmembran verantwortlich.

Weiterhin ist die TMD für die Assoziation der NA mit *Lipid rafts* sowie für die apikale Sortierung entscheidend (Barman und Nayak, 2000).

Die Stiel-Domäne verbindet die enzymatische Domäne mit der TMD. Die Länge kann dabei variieren. Bei der Adaption aviärer Viren an domestiziertes Geflügel, wie zum Beispiel Hühner kommt es zu einer Deletion in der Stieldomäne, wodurch die NA verkürzt wird (Yamada et al., 2012; Matrosovich et al., 1999). NAs mit verkürzter Stieldomäne sind dennoch in der Lage Sialinsäuren abzuspalten. Es wird vermutet, dass die Deletion eine Anpassung der Viren ist, um die Balance zwischen HA und NA aufrechtzuhalten (Yamada et al., 2012; Long, Benfield und Barclay, 2014).

Die ED ist für die Abspaltung endständiger Sialinsäuren verantwortlich. Dabei bildet die ED eine Tasche am Kopf der NA (s. Abb. 1.8). Diese Tasche wird durch Aminosäuren flankiert, die in vielen NAs konserviert vorliegen (zusammengefasst in Air und Laver, 1989). Ähnlich wie das HA besitzt die NA eine Spezifität für unterschiedlich verknüpfte Sialinsäuren. So spalten NAs aviärer Viren hauptsächlich Sialinsäuren von $\alpha 2$ -3-verknüpften Rezeptoren ab. Bei der Adaption aviärer Viren an den Menschen ändert sich die Präferenz der NA zu $\alpha 2$ -6-verknüpften Sialinsäuren. Dennoch sind die NAs humaner Viren in der Lage auch $\alpha 2$ -3-verknüpfte Sialinsäuren abzuspalten (Kobasa et al., 1999; Baum und Paulson, 1991). Neben der Spezifität können NAs aus verschiedenen Viren sich in ihrer Aktivität, d.h. in der Menge der abgespaltenen Sialinsäuren, unterscheiden. NAs aviärer Viren spalten im Allgemeinen mehr Sialinsäuren ab als NAs humaner Viren (Suzuki et al., 2003). Die Neuraminidase-Aktivität kann von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Virusreplikation sein. Sie hilft den IAV sich von Rezeptoren zu lösen, die auf nicht zellulären Proteinen vorhanden sind (Matrosovich et al., 2004a; Cohen et al., 2013). Solche Proteine, wie z. B. Muzine, kommen im Mucus vor und bilden eine erste Verteidigung gegen Pathogene (s. 1.7.1) (zusammengefasst in Thornton et al., 2008).

Nach erfolgter Replikation in der Wirtszelle verhindert die Sialidase-Aktivität der NA, dass neu gebildete Viren nicht an die bereits infizierte Zelle binden und sich somit effektiv von der Wirtszelle lösen (Wagner, Matrosovich und Klenk, 2002). Weiterhin desialyliert die NA neu synthetisierte Viren, was verhindert, dass diese aneinander binden und Cluster bilden (Palese et al., 1974).

Für eine effiziente Infektion ist eine optimale Balance zwischen der HA-vermittelten Rezeptorbindung und der rezeptorzerstörenden Funktion seitens der NA wichtig (Wagner, Matrosovich und Klenk, 2002; Ohuchi et al., 2006; Yen et al., 2011). Ein stark bindendes HA in Kombination mit einer schwachen NA würde zu einer starken Hemmung durch Rezeptoranaloga oder zu einem Verweilen von neu synthetisierten Viren auf der schon infizierten Zelle führen. Andererseits würde ein schwach bindendes HA mit einer starken NA dazu führen, dass die Rezeptoren schneller abgespalten werden als das HA diese Rezeptoren binden kann. Die Balance hat also einen Einfluss auf die Replikationseffizienz, auf die Sensitivität gegenüber Inhibitoren

im Mucus, auf die Virulenz und auf die Transmission (Gerlach et al., 2012; Xu et al., 2012; Diederich et al., 2015; Yen et al., 2011).

Neben der ED gibt es eine weitere Domäne, die terminale Sialinsäuren binden kann: die HAD (s. Abb. 1.8) (Laver et al., 1984). Die HAD wird durch drei Peptidschleifen gebildet, in denen fünf Aminosäuren konserviert vorliegen: 367S, 370S, 372S, 400N und 403W (Kobasa et al., 1997).

Die HAD kommt ausschließlich in aviären Viren vor. Bei der Übertragung von IAV vom Vogel auf den Menschen treten Mutationen auf, die zum Verlust der HAD führen. Die genaue Funktion der HAD ist nicht bekannt. Man vermutet, dass sie es der NA ermöglicht lange, hochsialylierte Proteine zu binden und die Abspaltung der Sialinsäuren von diesen Proteinen zu erleichtern (Uhlendorff et al., 2009).

Weiterhin wurde gezeigt, dass eine erhöhte NA-Aktivität zu einer früheren Induktion der HA-vermittelten Fusion beiträgt (Reed et al., 2010; DuBois et al., 2011). Allerdings ist der Mechanismus wie die NA die pH-Stabilität beeinflusst nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die erhöhte NA-Aktivität die Ablösung des HAs vom Rezeptor im Endosom erleichtert und somit die Fusion schneller eingeleitet werden kann (DuBois et al., 2011). Da die NA auch einen Einfluss auf die Virusstruktur und somit auf die Verteilung der HA-Moleküle hat, könnte dies auch einen Einfluss auf die HA-vermittelte Fusion haben (Zhang et al., 2000; Jin et al., 1997).

Die NA ist neben dem M2-Protein ein Ziel spezifischer Influenza-Medikamente. Das Medikament Tamiflu beinhaltet Oseltamivirphosphat, das in das Substrat Oseltamivircarboxylat (OC) hydrolysiert wird und als Substratanalog dient. Dieses Substrat hemmt kompetitiv die NA. Dieses Medikament wird vor allem bei schweren Krankheitsverläufen verabreicht. Allerdings führt die Gabe zur Entstehung von Oseltamivir-resistenten NAs. Diese weisen unter anderem die Mutation H275Y (N1-Nummerierung) auf, welche die Viren weniger sensitiv gegenüber OC macht (Gubareva, Webster und Hayden, 2001).

1.6 Epidemiologie

1.6.1 Pandemien

Im Lauf der letzten 100 Jahre gab es vier große IAV-Pandemien. Pandemien entstehen durch das Aufeinandertreffen eines neuen IAV auf eine für das Virus immunologisch naive Bevölkerung. Diese pandemischen Viren können dabei einen neuen Subtyp repräsentieren oder durch Wiedereinführung eines alten IAV-Subtyps entstehen (Taubenberger und Morens, 2009; Garten et al., 2009). Pandemische Viren treten global auf und übertragen sich sehr effizient zwischen Menschen (WHO, 2016b). Es gibt zwei Modelle wie sie entstehen können. Zum einen können pandemische Viren durch einen *antigenic shift*, einem Reassortierungsereignis, entstehen.

Reassortierung bezeichnet den Austausch von Gensegment zwischen mindestens zwei Viren, die dieselbe Zelle infiziert haben. Durch den Austausch der Gensegmente können antigenetisch neue Viren entstehen. In Bezug auf die Antigenität pandemischer Viren ist besonders der Austausch der Oberflächenproteine HA und NA von entscheidender Bedeutung (Kuntz-Simon und Madec, 2009).

Zum anderen können pandemische Viren auch durch einen sogenannten *antigenic drift* entsteht. Darunter versteht man die Entstehung pandemischer Viren durch Mutationen in den einzelnen Proteinen, die die Antigenität signifikant beeinflussen. Durch die Mutationen entstehen Viren, gegen die kein Immunschutz in der Population vorhanden ist (Kuntz-Simon und Madec, 2009).

Die Spanische Grippe war ein IAV des Subtyps H1N1 und wurde um 1918 vom Vogel auf den Menschen übertragen. Während dieser Pandemie starben mindestens 20 Millionen Menschen (zusammengefasst in Horimoto und Kawaoka, 2001). Dieses Virus entstand wahrscheinlich durch die Adaption eines vollständigen aviären Virus an den Menschen (*antigenic drift*) und zirkulierte bis zum Jahr 1957 im Menschen (Taubenberger und Morens, 2009).

Im Jahr 1957 trat die Asiatische Grippe des Subtyps H2N2 auf. Dabei wurden die Gene HA und NA, sowie das PB1-Gen des H1N1-Virus (Spanische Grippe) durch die Gensegmente eines aviären Virus ausgetauscht. Die verbleibenden Gensegmente entstammten einem humanen Virus. Dieses Virus ersetzte das bis dahin zirkulierende H1N1-Virus. Bis 1968 zirkulierte dieses Virus im Menschen. An diesem IAV starben 1957 ca. 1 Million Menschen (Taubenberger und Morens, 2009).

1968 kam es zum Ausbruch der Hongkong Grippe, einem H3N2 Virus, an dem ca. 500.000 Menschen starben. Bei diesem Virus wurden durch Reassortierung mit einem aviären Virus das HA- und das PB1-Gen des H2N2-Virus der Asiatischen Grippe ausgetauscht (Taubenberger und Morens, 2009). Seit 1968 zirkuliert der Influenza-Subtyp H3N2 im Menschen.

Die bisher letzte Pandemie war die so genannte Schweinegrippe von 2009. Dies war ein Virus des Subtyps H1N1, welches vom Schwein auf den Menschen übertragen wurde. Es entstand aus einem porzinen Virus, welches das NA- und M-Gen eines eurasischen Schweinevirus sowie die verbleibenden Gensegmente einer Tripelreassortante aus dem Schwein (Neumann, Noda und Kawaoka, 2009). Während des Zeitraums der Pandemie von 2009 bis August 2010 zählte die WHO knapp 1 Millionen infizierte Personen von denen 18449 starben (WHO, 2011). Dieses Virus zirkuliert bis heute im Menschen und ist mittlerweile ein saisonal zirkulierendes Virus (WHO, 2016c).

1.6.2 Saisonale Influenza

Neben pandemischen Viren zirkulieren im Menschen so genannte saisonale Influenza-A-Viren. Diese Viren gehen aus pandemischen Viren hervor, weisen jedoch nicht die für pandemische

Viren typische Mortalität und Morbidität auf (Klenk, 2012). Momentan treten saisonale IAV der Subtypen H3N2, die aus dem pandemischen Virus von 1968 hervorgehen, und H1N1, die aus dem pandemischen Virus von 2009 hervorgehen, auf. In der Zeit von 1957 bis 1968 zirkulierte weiterhin ein saisonales Virus des Subtyps H2N2, welches aus der asiatischen Grippe hervorging (zusammengefasst in Wendel et al., 2015). Durch die hohe Anzahl an jährlichen Infektion kommt es unter den saisonalen Viren regelmäßig zu Mutationen (*antigenic drift*), die die Antigenität beeinflussen, weswegen jährlich ein neuer Impfstoff gegen IAV prouziert werden muss.

Im Gegensatz zu pandemischen Viren sind saisonale Viren weniger pathogen, da ein Immunschutz in der Bevölkerung schon teilweise vorhanden ist. Dennoch kommt es jährlich zu ca. 3 bis 5 Millionen Infektionen durch saisonale IAV, die in ca. 250.000 bis 500.000 Todesfällen resultieren (WHO). Risikogruppen für einen schweren Krankheitsverlauf sind dabei vor allem Menschen über 65 Jahren und Kinder unter 5 Jahren (Thompson et al., 2009; Nair et al., 2011)

1.6.3 Zoonotische Infektionen durch aviäre Influenza

Zoonotische Infektion durch aviäre IAV können im Menschen eine Krankheit mit schwerem Verlauf auslösen (Gao et al., 2013; Yuen et al., 1998). Diese Viren zirkulieren effizient in Vögeln und durch den engen Kontakt der Menschen mit Geflügel kommt es zu Übertragungen der Viren auf den Menschen (Taubenberger und Morens, 2009). Die bekanntesten Vertreter einer aviären Influenza im Menschen sind Viren der Subtypen H5N1 und H7N9. Die meisten der humanen Infektionen mit diesen Viren können auf den Kontakt von Menschen mit infiziertem Geflügel zurückgeführt werden (WHO, 2016b). Eine effiziente Mensch-zu-Mensch Übertragung dieser Viren ist bisher nicht beobachtet worden, auch wenn es einzelne Übertragungen im familiären Umfeld gab (Qi et al., 2013). Im Gegensatz zu saisonalen oder pandemischen Viren ist die Transmission aviärer Viren zwischen Menschen ineffizient, weil man annimmt, dass diese Viren nicht ausreichend für eine effiziente Übertragung auf und zwischen Menschen angepasst sind (zusammengefasst in Neumann und Kawaoka, 2015b).

IAV des Subtyps H5N1 wurden zum ersten Mal 1997 vom Vogel auf den Menschen übertragen (de Jong et al., 1997). Dieses Virus besitzt eine multibasische Spaltstelle und gehört daher zu den HPAI (Yuen et al., 1998). Es zeichnete sich durch eine hohe Pathogenität sowie eine hohe Sterblichkeit unter den infizierten Menschen aus. Eine Infektion mit einem H5N1-Virus im Menschen kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen. So sind neben den klassischen Grippesymptomen auch Hämorrhagien, das Reye-Syndrom, Nierenversagen und septischer Schock beschrieben worden (Yuen et al., 1998). Seit 1997 kommt es regelmäßig zur Übertragung von H5N1 auf den Menschen. In den Jahren 2003 und 2004 kam es zu einem größeren Ausbruch eines H5N1-Virus in Vietnam und Thailand. Ein Isolat dieses Ausbruchs, A/Vietnam/1203/2004, ist ein sehr gut untersuchtes Virus, welches auch in dieser Arbeit genutzt wird (s. 2.4). Der letzte

größere Ausbruch von H5N1-Viren fand 2015 in Ägypten statt, bei dem 136 bestätigte Fälle auftraten, von denen 39 starben (WHO, Stand Oktober 2016). Insgesamt sind seit 2003 856 Fälle einer H5N1-Infektion im Menschen registriert worden, von denen 452 Personen starben (WHO, 2016a). Im Geflügel können diese Viren Ausbrüche verursachen, die mit einer Mortalitätsrate von bis zu 70 % einhergehen (Claas et al., 1998). Eingedämmt werden diese Ausbrüche meist durch Vernichtung des infizierten Geflügels.

IAV des Subtyps H7N9 wurden zum ersten Mal 2013 in Asien im Menschen nachgewiesen. Dieses Virus wird zu den LPAI gezählt (Gao et al., 2013). Seine Ausbreitung beschränkt sich bisher auf den asiatischen Raum (WHO, 2016b). Obwohl es zu den LPAI gezählt wird zeichnet es sich durch eine hohe Pathogenität im Menschen aus. Die Symptome, die bei einer schweren Infektion auftreten, reichen von respiratorischen Symptomen, Diarrhoe und Erbrechen bis zum *acute respiratory disease syndrom* (ARDS), Pneumonie, Rhabdomyolyse und septischer Schock (Liu, Liu und Yang, 2013; Gao et al., 2013). Seit Auftreten dieses Virus sind 793 Menschen am H7N9-Subtyp erkrankt, von denen 319 starben (Stand: Oktober 2016) (WHO, 2016b). Im Gegensatz zum H5N1-Subtyp kommt es bei der Infektion von Geflügel durch das H7N9 zu keiner Symptomatik, was die Nachverfolgung der Ausbreitung erschwert (zusammengefasst in Bui et al., 2016).

1.7 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Pathogene. Zu ihr zählen physikalische Barrieren, wie zum Beispiel Mucus und Kollektine, sowie das angeborene TypI-Interferon-System (IFN- α/β), welches die Expression von über 300 antiviraler Interferon-stimulierte Gene (ISGs) stimuliert (zusammengefasst in Tripathi, White und Hartshorn, 2013).

1.7.1 Mucus in den Atemwegen

Mucus ist eine gelartige Schutzschicht, die sich auf vielen Epithelien, wie z.B. den Atemwegsepithelien oder auch den Epithelien im Gastrointestinaltrakt, befindet (Voynow und Rubin, 2009). Die Mucuskomponenten werden von Mucus-produzierenden sekretorischen Zellen sowie von subepithelialen Drüsen produziert und apikal sezerniert (Lamblin et al., 1984). Auf dem Atemwegsepithel bildet der Mucus eine 4-7 μm dicke gelartige Schicht (s. Abb. 1.9). In dieser Mucusschicht können Staubpartikel und Pathogene eingefangen werden. Durch das Schlagen der Zilien auf der apikalen Seite ziliierter Zellen werden die Pathogene in Richtung Pharynx transportiert, wo sie dann verschluckt werden (s. Abb. 1.9) (Knowles und Boucher, 2002).

Der Mucus besteht zu 97-99 % aus Wasser und zu 1-3 % aus Feststoffen, inklusive Ionen und Proteinen. Im Mucus konnten über 190 verschiedene Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden (Kesimer et al., 2009; Ali et al., 2011). Die am häufigsten darin vorkommenden Proteine sind die sogenannten Muzine (Ali et al., 2011).

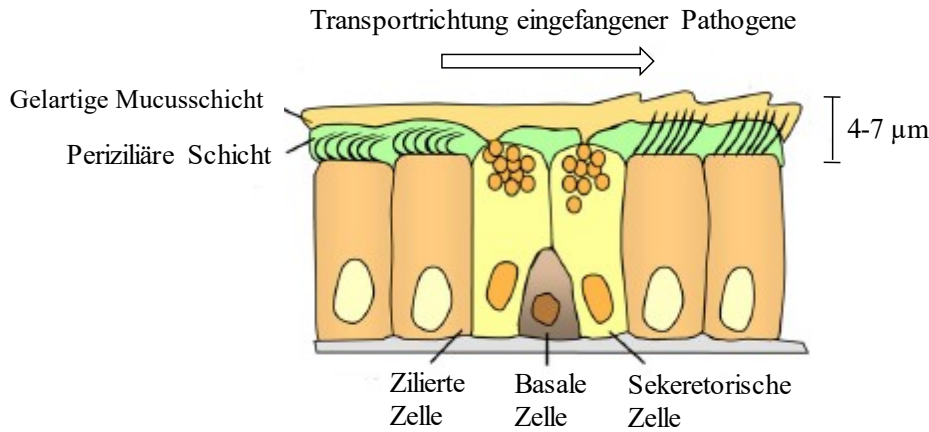


Abbildung 1.9: Aufbau und Funktion des Atemwegsepithels (modifiziert von Tilley, Walters, Shaykhiev, & Crystal, 2015).

Neben Muzinen können auch so genannte Exosomen in Mucussekretionen vorkommen (Kesimer et al., 2009b). Dies sind membranumhüllte Vesikel, die unter anderem membrangebundene Muzine auf ihrer Oberfläche aufweisen können (Kesimer et al., 2013; Kesimer et al. 2009).

In humanem Mucus konnten sowohl α 2-6- als auch α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren nachgewiesen werden, welche die Rezeptoren für aviäre und humane IAV sind (Ehre et al., 2012; Kesimer et al., 2009). Das Vorkommen aviärer und humaner Rezeptoren im Mucus kann variieren. So wiesen Mucusproben von Patienten mit zystischer Fibrose α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren in erhöhtem Maße auf und nur geringe Mengen α 2-6-verknüpfter Sialinsäuren (Shori et al., 2001).

Couceiro et al. zeigten in ihren Experimenten, dass humane Viren an die Oberfläche von Atemwegsepithelien binden konnten, während aviäre Viren ausschließlich an Mucus-Vesikel in Becherzellen binden (Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Sie schlussfolgerten daraus, dass verschiedene Selektionsdrücke bei der Adaption der Rezeptorspezifität aviärer IAV an den Menschen auf die IAV wirken: zum einen die Notwendigkeit eine hohe Affinität für den Rezeptor auf der Zelle zu haben und zum anderen eine geringe Affinität für Rezeptoren auf mucosalen Proteinen (Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Dies führte zu dem Schluss, dass aviäre Viren an humanen Mucus binden und somit die Infektion gehemmt wird, während humane Viren nicht bzw. schwach an den Mucus binden und somit nicht gehemmt werden. Dies könnte erklären, warum aviäre Viren den Menschen so ineffizient infizieren (Limsuwat et al., 2013; Nicholls, 2013; Scharfman, Lamblin und Roussel, 1995).

Auf der anderen Seite zeigten andere Gruppen, dass Mucus die Infektion humaner Viren in Zellkultur deutlich hemmt, während die Infektion aviärer Viren nur leicht gehemmt wird (Roberts et al., 2011; Limsuwat et al., 2013).

In vitro konnte weiterhin gezeigt werden, dass humane und aviäre Viren ausdifferenzierte Kulturen des tracheo-bronchialen Epithels, welche Mucus auf die Oberfläche sezernieren, infizieren können (Matrosovich et al., 2004b). Auch kommt es regelmäßig zur Infektion von Menschen durch Viren mit aviärer Rezeptorspezifität (Nicholls et al., 2007; Yu et al., 2011). Diese Ergebnisse widersprechen dem allgemeinen Konzept, weswegen die Interaktion von Mucus mit IAV kontrovers diskutiert wird. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von Mucus mit IAV und seine protektive Rolle gegenüber einer IAV-Infektion näher zu untersuchen.

1.7.2 Angeborene Immunantwort gegen IAV

Zur Induktion der antiviralen Immunantwort müssen Viren durch zelluläre Sensoren detektiert werden. Die Aktivierung dieser Sensoren führt zur Expression antiviraler und proinflammatorischer Proteine. IAV können von *Toll-like-receptors* (TLRs), *retionic acid inducible gene-I* (RIG-I) Rezeptoren und *nucleotide oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren detektiert werden (zusammengefasst in Pulendran und Maddur, 2014).

Der endosomal vorliegende TLR7-Rezeptor detektiert einzelsträngige virale RNA, nachdem RNP-Komplexe in den Endosomen degradiert wurden. Die Rezeptoren TLR2 und TLR4 erkennen wahrscheinlich die viralen Glykoproteine HA und NA. Die aktivierten TLR-Rezeptoren aktivieren *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), das den TNF- α -Rezeptor assoziierten Faktors 6 (TRAF6) aktiviert, welcher wiederum die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und den *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) aktiviert (zusammengefasst in van de Sandt, Kreijtz und Rimmelzwaan, 2012).

RIG-I detektiert intrazellulär 5'-triphosphorylierte, doppelsträngige RNA, wie sie auch in der Promoterregion der IAV-RNPs vorliegt (Weber et al., 2013; Weber und Weber, 2014). Daraufhin interagiert RIG-I mit dem *mitochondrial antiviral signaling adapter* (MAVS) (zusammengefasst in Belgnaoui, Paz und Hiscott, 2011). Dieser aktiviert über eine Signalkaskade die Transkriptionsfaktoren *interferone regulatory factor* (IRF) IRF3 und IRF7. Parallel dazu werden auch die Kinasen IKK α und IKK β aktiviert, welche NF- κ B aktivieren. Diese Transkriptionsfaktoren migrieren in den Nukleus und initiieren die Expression der Interferone (IFN) α und β sowie anderer proinflammatorischer Zytokine (zusammengefasst in Weber und Weber, 2014).

IFN- β wird als erste Immunantwort auf eine Virusinfektion sezerniert und kann autokrin oder parakrin wirken. Es ist ein Typ I-IFN und bindet an den IFN- α/β -Rezeptor, was zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweg führt (zusammengefasst in Schneider, Chevillotte und Rice, 2015).

Die Bildung dieses Faktors führt zur Produktion der mRNA von über 300 ISGs. Bisher sind jedoch noch nicht alle Genprodukte sowie ihre Funktion bekannt. Für einige der ISG-Produkte konnte ein antiviraler Effekt nachgewiesen werden, wie z.B. MxA, OAS, Viperin, Tetherin und *Interferon induced transmembrane proteins* (IFITM) (zusammengefasst in van de Sandt et al., 2012).

Die 2'-5' *oligoadenylate synthetase* (OAS) inhibiert die virale Replikation, indem sie die RNase L aktiviert. Die RNase L wiederum degradiert sowohl zelluläre als auch virale RNA. Dies führt zu einem generellen Translationsstopp innerhalb einer Zelle und kann zur Apoptose der infizierten Zelle führen (zusammengefasst in Silverman, 2007).

Das MxA-Protein wird bei IFN-Stimulation durch Interferone vom Typ I und Typ III exprimiert. Es zeigt eine antivirale Wirkung gegen viele verschiedene Viren, u.a. auch IAV. Dabei inhibiert es, zusammen mit anderen IFN-abhängigen Faktoren, den Transport von RNP-Komplexen in den Nukleus. MxA inhibiert nicht die primäre Transkription von IAV. Jedoch inhibiert es im weiteren Verlauf der Infektion die Replikation von IAV (zusammengefasst in Haller, Staeheli und Kochs, 2007; Haller et al., 2015).

1.7.2.1 IFITM-Protein Familie

IFITMs (*Interferon induced transmembrane proteins*) sind eine Proteinfamilie deren Expression durch Typ I- und Typ II-Interferone induziert wird. Bisher sind fünf humane IFITM-Proteine, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFITM5 und IFITM10, bekannt (zusammengefasst in Ferreira et al., 2013). Die IFITM-Proteine IFITM1, IFITM2 und IFITM3 zeigen einen antiviralen Effekt gegen unterschiedliche Virusfamilien, u.a. *Filoviridae* und *Orthomyxoviridae* (Brass et al., 2009; Huang et al., 2011; Ferreira et al., 2013). Sowohl die Infektion umhüllter als auch nicht umhüllter Viren kann durch IFITM1, IFITM2 und IFITM3 gehemmt werden (Smith et al., 2014; Anafu et al., 2013).

IFITM-Proteine weisen zwei hydrophobe Domänen auf. Ob es sich dabei um Transmembran- oder Intramembrandomänen handelt ist noch nicht abschließend geklärt. Zwischen den hydrophoben Domänen befindet sich ein hoch konservierter intrazellulärer Loop (Brass et al., 2009). Wie genau die einzelnen Domänen der IFITM-Proteine in der Membran angeordnet sind, ist nicht vollständig bekannt. Ein Modell besagt, dass die Proteine zwei TMD aufweisen und sowohl der C- als auch der N-Terminus im ER-Lumen vorliegen. Ein anderes Modell besagt, dass beide Termini im Zytosol vorliegen und die hydrophoben Domänen als Intramembrandomänen fungieren. Das dritte Modell besagt, dass der N-Terminus im Zytosol vorliegt, der C-Terminus hingegen im ER-Lumen. Dabei fungiert eine hydrophobe Domäne als TMD und die andere als Intramembrandomäne (zusammengefasst in Bailey et al., 2014).

IFITM2 und IFITM3 kolokalisieren mit Endosomen- und Lysosomenmarkern, wie LAMP1 und CD63 (Huang et al., 2011; Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013). Aber auch Marker des frühen Endosoms, wie Tfr oder EEA1, kolokalisieren mit IFITM3 (Weston et al., 2016). Somit wird davon ausgegangen, dass Viren, die die Zelle über das Endosom oder das Lysosom infizieren, durch die dort vorkommenden IFITM-Proteine gehemmt werden. IFITM-Proteine konnten auch in geringen Mengen an der Zellmembran detektiert werden. Durch ein Endozytose-Motiv (YXXΦ) können sie jedoch wieder internalisiert werden. Über die Lokalisation von IFITM1 ist weniger bekannt. Erste Studien deuten darauf hin, dass IFITM1 in anderen subzellulären Kompartimenten wie IFITM2 und IFITM3 vorkommt (zusammengefasst in Perreira et al., 2013). Die genaue Funktionsweise der IFITM-Proteine ist nicht bekannt. Zum einen wird vermutet, dass sie die Fusion hemmen, indem sie die Membran versteifen. Zum anderen wird vermutet, dass IFITM-Proteine die Ansäuerung der Endosomen beeinflussen, was der Auslöser der Membranfusion von manchen Viren ist, und somit das Überwinden der Endosomenmembran durch Viren verhindern (zusammengefasst in Bailey et al., 2014). Bisher wurde jedoch lediglich nachgewiesen, dass IFITM-Proteine den Eintritt von Viren in das Zytoplasma hemmen (Feeley et al., 2011). Neuere Daten weisen darauf hin, dass im Falle umhüllter Viren die Hemifusion bzw. die Bildung der Fusionsporen inhibiert wird (Desai et al., 2014; Li et al., 2013). Weiterhin wird darüber diskutiert ob die IFITM-Proteine über ihre Interaktion mit VAPA (*Vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) die Cholesterol-Verteilung im Endosom beeinflussen und über diesen Mechanismus die virale Fusion inhibieren (Wensch, Winkler und Pöhlmann 2014; Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013).

Es wird vermutet, dass die Sensitivität der Viren gegenüber den IFITM-Proteinen davon abhängig ist, in welchem zellulärem Kompartiment sie fusionieren (Narayana et al., 2015; Savidis et al., 2016). Somit würden IFITM2 und IFITM3 Viren hemmen, die im Endosom die Fusion induzieren. Bisher ist nicht bekannt, ob die Virussensitivität gegenüber IFITM-Proteinen auch abhängig vom Fusions-pH der Viren ist. Sollte dies der Fall sein, könnte die Sensitivität von IAV sowohl durch das HA als auch die NA, die beide einen Einfluss auf den Fusions-pH haben, beeinflusst werden. Auch wenn viele Studien zur antiviralen Wirkung von IFITM-Proteinen durchgeführt wurden, ist die genaue Funktionsweise dieser Proteinfamilie nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.7.2.2 Viperin und Tetherin

Viperin und Tetherin sind IFN-induzierte Genprodukte, die sowohl durch Typ I- als auch Typ II-IFN induziert werden können. Viperin inhibiert die Replikation verschiedener Viren, wie z.B. IAV, Dengue- oder Hepatitis-C-Viren. Die Inhibition findet dabei jedoch erst in späteren Phasen der Replikation statt. Im Falle von IAV interferiert Viperin mit dem viralen *Budding*. Dabei

scheint Viperin die *Lipid Rafts* und somit die Region der Zellmembran zu zerstören von denen Viren abknospen (zusammengefasst in Wang, Hinson und Cresswell, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass Tetherin, auch BST-2 genannt, die Replikation verschiedener Viren inhibieren kann, darunter auch IAV (zusammengefasst in Swiecki, Omattage und Brett, 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass die antivirale Wirkung darauf beruht das virale *Budding* zu inhibieren, indem neue IAV-Partikel an der infizierten Zelle zurückgehalten werden (Mangeat et al., 2012). Dabei spielt die NA eine entscheidende Rolle in der IAV-Sensitivität gegenüber Tetherin, da sie bei der viralen Abknospung eine wichtige Funktion hat (s. 1.5) (Yondola et al., 2011; Leyva-Grado et al., 2014). Mangeat et al. zeigten, dass die NA die Glykosylierung des Tetherins beeinflusst und somit vermutlich auch die antivirale Aktivität dieses Proteins (Mangeat et al., 2012). Ob die Virussensitivität gegenüber Viperin, welches die Membranfluidität der Zelle beeinflusst, ebenfalls durch die NA beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

1.7.3 Interaktion viraler Proteine mit dem IFN-System

IAV haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort entgegenzuwirken. Dabei beeinflussen virale Proteine die Produktion von Interferonen, zelluläre antivirale Proteine, oder die zelluläre mRNA-Synthese.

NS1 ist ein Virulenzfaktor der IAV. Es konnte gezeigt werden, dass IAV mit einem defekten NS1 im Tierversuch eine reduzierte Virulenz aufweisen. NS1 bindet die virale RNA und hemmt somit die Detektion von RNP-Komplexen durch RIG-I, PKR und OAS. Weiterhin hemmt NS1 die Oligomerisierung von TRIM25, welches wichtig für die posttranslationale Modifikation von RIG-I sowie für die Interaktion mit PKR ist. Auch die Aktivierung und die nukleäre Translokation von IRF-3, NF- κ B und ATF-2/c-Jun wird durch NS1 gehemmt (zusammengefasst in Marc, 2014). NS1 inhibiert zudem die mRNA-Prozessierung, was die IFN-Expression sowie die Expression von ISGs hemmt (zusammengefasst in Goraya et al., 2015). Es wurde vermutet, dass die NS1-Aktivität aviärer Viren die Ursache für die schwache Replikation aviärer Viren in Säugern sei. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch NS1-Proteine aviärer Viren die IFN-Antwort von Säugern vergleichbar gut hemmen wie NS1-Proteine humaner Viren (Hayman et al., 2007). Viren mit einem trunkierten NS1, welches seine IFN-inhibierende Funktion verloren hat, konnten in Hühner-Zellen in Anwesenheit von Hühner-IFN zu vergleichbaren Titern replizieren wie das Virus mit intaktem NS1 (Cauthen et al., 2007; Marcus et al., 2010).

Der Polymerase-Komplex benötigt bei der mRNA-Synthese die 5'-Caps der zellulären mRNA. Das so genannte *Cap-snatching* durch das PA-Protein sorgt indirekt dafür, dass die zelluläre Genexpression inhibiert wird, da deren mRNA aufgrund des fehlenden Caps nicht translatiert werden kann (zusammengefasst in Goraya et al., 2015).

PB1-F2 ist in der Lage, die Produktion von IFN- β zu inhibieren indem es mit MAVS assoziiert. MAVS wird für die Induktion von IFN durch den RLR-Signalweg (*RIG-I like receptor*) benötigt. Somit inhibiert PB1-F2 die IFN-Expression (Varga et al., 2011).

PB2 interagiert ebenso wie PB1-F2 mit MAVS und kann somit die IFN-Expression inhibieren (Goraya et al., 2015). Ein weiterer Mechanismus bei der Evasion der Immunantwort seitens des PB2 besteht in der adaptiven Mutation E627K. Bei der Adaption aviärer Viren an den Menschen kommt es zu der Punktmutation E627K im PB2. Diese Mutation führt dazu, dass RIG-I schwächer an die RNPs bindet, wodurch RIG-I schlechter aktiviert wird (Weber et al., 2015).

Inwiefern jedoch die beiden Glykoproteine den IAV helfen, der angeborenen Immunantwort zu entkommen ist noch nicht im Detail bekannt.

1.8 Zielsetzung

Die zoonotischen Influenza-A-Viren (IAV) der Subtypen H5N1 und H7N9 verursachen im Menschen eine schwere Erkrankung mit hohen Mortalitätsraten bis zu 53 %. Die Gründe für die hohe Mortalität und Pathogenität sind bisher nicht bekannt.

Bei der Infektion sind die Viren verschiedenen Faktoren der angeborenen Immunantwort ausgesetzt und müssen diese umgehen. Einer dieser Faktoren ist die Mucusschicht, die die apikale Seite des Respirationstraktes bedeckt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen IAV und Mucus näher zu untersuchen und somit die vorliegende Diskrepanz zu erklären (s. 1.7.1). Dafür sollten IAV in verschiedenen Zellsystemen auf ihre Sensitivität gegenüber Mucus sowie die Mucuseigenschaften untersucht werden.

Nach der Infektion werden IAV innerhalb der Zelle detektiert, was zur Sekretion von IFN- β führt. IFN- β induziert die Expression verschiedener antiviraler Proteine. Eine verringerte Sensitivität der Viren gegenüber antiviralen Effektormolekülen könnte in einer erhöhten Pathogenität resultieren. Die hohe Pathogenität zoonotischer Viren wurde auf die Interaktion der Polymerasegene sowie des NS1 mit zellulären Proteinen zurückgeführt. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Präferenz zoonotischer Viren für sulfatierte Rezeptoren (s. 1.4.1) ebenfalls zu deren hoher Pathogenität beiträgt. Bisher ist jedoch nicht bekannt, inwiefern die Rezeptorbindungs- und Fusionseigenschaften des HAs und die Eigenschaften der NA einen Einfluss auf die Infektion von IFN- β -stimulierten Zellen haben. Deswegen sollten rekombinante Viren mit HAs und NAs verschiedener repräsentativer aviärer, zoonotischer und humaner Viren untersucht werden. Die rekombinanten Viren wurden auf ihre Rezeptorbindungs- und Fusions-Eigenschaften untersucht. Anschließend sollten die Viren auf ihre Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status überprüft werden. Sollten die Fusions-Eigenschaften einen Einfluss auf die Sensitivität der Viren gegenüber IFN haben, so sollte die Sensitivität gegenüber Fusions-hemmenden antiviralen Proteinen, IFITMs, näher untersucht werden.

2 Material

2.1 Plasmide

Plasmidname	Virusstrang	Herkunft
pHW2000-HA (HK/68)	A/Hong Kong/1/1968	Tatyana Matrosovich
pHW2000-NA (HK/68)	A/Hong Kong/1/1968	Tatyana Matrosovich
pHW2000-malH2N2/HA	A/Mallard/New York/6750/1978	Yoshihiro Kawaoka
pHW2000-malH2N2/NA	A/Mallard/New York/6750/1978	Yoshihiro Kawaoka
pHW2000-R2/HA	A/Hong Kong/1/1968	Tatyana Matrosovich
pHW2000-ShH7N9/HA	A/Shanghai/1/2013	Jan Baumann
pHW2000-ShH7N9/NA	A/Shanghai/1/2013	Jan Baumann
pHW2000-malH7N1/HA	A/Mallard/Alberta/34/2001	Janina Bergmann
pHW2000-malH7N1/NA	A/Mallard/Alberta/34/2001	Janina Bergmann
pHW2000-PB2 (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000-M (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000-NP (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000-NS (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000-PA (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000-PB1 (PR8)	A/Puerto Rico/8/1934	Robert Webster
pHW2000	Zur Verfügung gestellt von Erich Hoffmann und Robert Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA	

2.2 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

Primer	Sequenz
HK/68-HA H17 ₁ R For	5'CGCTGTGCCTGGGACGTCATGCGGTGCCAAAC3'
HK/68-HA H17 ₁ R Rev	5'GTTTGGCACCGCATGACGTCCCAGGCACAGCG3'
HK/68-HA H17 ₁ Y For	5'CAACGCTGTGCCTGGGATATCATGCGGTGCCAAAC3'
HK/68-HA H17 ₁ Y Rev	5'GTTTGGCACCGCATGATATCCCAGGCACAGCGTTG3'
HK/68-HA K82 ₂ T For	5'CAGGACCTCGAGACATACGTTGAAGACAC3'
HK/68-HA K82 ₂ T Rev	5'GTGTCTTCAACGTATGTCTCGAGGTCCTG3'
HK/68-HA Y98 ₁ F For	5'GCTTTCAGCAACTGTTTCCCTTATGATGTGCC3'
HK/68-HA Y98 ₁ F Rev	5'GGCACATCATAAGGGAAACAGTTGCTGAAAGC3'
pHW-For	5'CTCACTATAGGGAGACCC3'
pHW-Rev	5'GAGGTATATCTTTCGCTCC3'
HA-Bm For	5'TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG3'
HA-Bm Rev	5'ATATCGTCTCGATATTAGTAGAAACAAGGAG3'
NA-uni For	5'CTACAGCAAAAGCAGGAGT3'
NA-uni Rev	5'GCAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT3'
NA-Bm For	5'TATTCGTCTCQGGGAGCAAAAGCAGGAGT3'
NA-Bm-Rev	5'ATATCGTCTCGTATTAGRAGAAACAAGGAG3'

2.3 Nicht-rekombinante Viren

Virusstrang	Eigenschaften	Herkunft
A/Thailand/KAN-1/2004	hochpathogenes H5N1-Virus, Isolat des Ausbruchs von 2004	Pilaipan Puthavathana, Mahidol University, Bangkok, Thailand
A/Anhui/01/2013	H7N9-Virus, Isolat des Ausbruchs von 2013	John McCauley, Crick Worldwide Influenza Centre, London, UK
A/Memphis/14/1996	saisonales, humanes Virus (H1N1)	Robert Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA
A/Hong Kong/1/1968	pandemisches Virus von 1968 (H3N2)	Earl Brown, University of Ottawa, Ottawa, Kanada
A/Hamburg/05/2009	pandemisches Virus von 2009 (H1N1)	Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg

2.4 Rekombinante Viren

Tabelle 2.1: Rekombinante Viren und Ursprung der einzelnen Gene

Virus	HA-Strang	NA-Strang	Strang interner Gene
Mem-H1N1	A/Memphis/14/1996	A/Memphis/14/1996	A/Puerto Rico/8/1934
mal-H1N1	A/Mallard/Alberta/119/1998	A/Mallard/Alberta/119/1998	A/Puerto Rico/8/1934
mal H2N2	A/Mallard/New York/6750/1978	A/Mallard/New York/6750/1978	A/Puerto Rico/8/1934
mal H7N1	A/Mallard/Alberta/34/2001	A/Mallard/Alberta/34/2001	A/Puerto Rico/8/1934
VN-H5N1	A/Vietnam/1203/2004	A/Vietnam/1203/2004	A/Puerto Rico/8/1934
Sh-H7N9	A/Shanghai/1/2013	A/Shanghai/1/2013	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-WT	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-H17R	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-H17Y	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-K82T	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-Y98F	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
HK/68-R2	A/Hong Kong/1/1968	A/Hong Kong/1/1968	A/Puerto Rico/8/1934
pdm09	A/Hamburg/5/2009	A/Hamburg/5/2009	A/Hamburg/5/2009
pdm09-sw/Iowa	A/Hamburg/5/2009	A/Swine/Iowa/2006	A/Hamburg/5/2009
pdm09-Thailand	A/Hamburg/5/2009	A/Thailand/271/2005	A/Hamburg/5/2009
pdm09-dk/Bavaria	A/Hamburg/5/2009	A/Duck/Bavaria/1/1977	A/Hamburg/5/2009
pdm09-human/Memphis	A/Hamburg/5/2009	A/Memphis/14/1996	A/Hamburg/5/2009

2.5 Enzyme

DpnI	Thermo Scientific, USA
Neuraminidase (V. cholerae)	Sigma Aldrich, Steinheim; Deutschland
Phusion Polymerase	MBI Fermentas, USA
Proteinase K	New England Biolabs, USA
Trypsin-EDTA	Gibco, BRL, Karlsruhe; Deutschland
Trypsin-TPCK	Sigma, Düsseldorf; Deutschland

2.6 Chemikalien

Agarose Seakem	Cambrex Bioscience, Rockland; USA
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg; Deutschland
Avicel	FMC Biopolymers; USA
Bakto Agar	Becton, Dickinson & Co.; USA
Betaferon	Schering; Deutschland
Borat/ Borsäure	Riedel-de-Haen, Seelze; Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	MP Biomedicals LLC, Berlin; Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt; Deutschland
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim; Deutschland
DNA-Marker GeneRuler™ 1kb DNA ladder	MBI Fermentas; USA
DNA-Marker GeneRuler™ DNA loading Dye	MBI Fermentas; USA
dNTPS	MBI Fermentas; USA
Ethanol (EtOH)	J.T. Baker; Niederlande
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe; Deutschland
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Roth, Karlsruhe; Deutschland
Fetale Calve Serum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe; Deutschland
Geneticin	Gibco BRL, Karlsruhe; Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe; Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt; Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt; Deutschland
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe; Deutschland
Lipofectamin™	Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt; Deutschland
Manganchlorid	Merck, Darmstadt; Deutschland

22-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim; Deutschland
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt; Deutschland
Natriumchlorid	Riedel-de-Haen, Seelze; Deutschland
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen, Seelze; Deutschland
Normal Horse Serum (NHS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland
Oseltamivircarboxylat (OC)	Roche; UK
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe; Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe; Deutschland
Pepton	Merck, Darmstadt; Deutschland
Polyethylen Glykol (PEG 4000)	Sigma-Aldrich, Steinheim; Deutschland
Puromycin	InvivoGen, San Diego; USA
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt; Deutschland
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim; Deutschland
Tris	Acros Organics, New Jersey; USA
Triton-X-100	Serva, Heidelberg; Deutschland
True Blue™ Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg; USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim; Deutschland

2.7 Medien

2x MEM	Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland	
1x DMEM	Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland	
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland	
Overlay-Medium	2x MEM	250 ml
	Penicillin/Streptomycin	5,5 ml
	BSA (30 %)	1,4 ml
Infektionsmedium	1x DMEM	500 ml
	Glutamin	5,5 ml
	Penicillin/ Streptomycin	5,5 ml
	BSA (30 %)	1,4 ml

Wachstumsmedium (Calu3, A549, MDCK)	1x DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	Glutamin	5,5 ml
	Penicillin/ Streptomycin	5,5 ml
Selektionsmedium IFITM2 und IFITM3 exprimierender MDCK- Zellen	1x DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	Glutamin	5,5 ml
	Penicillin/ Streptomycin	5,5 ml
	Pyromycin	5 µg/ml

2.8 Zelllinien

MDCK	<i>Madin Darby canine kidney cells</i> , permanente Epithelzelllinie aus der Niere eines Cockerspaniels
MDCK-SIAT	wie MDCK, exprimieren stabil die 2,6-Sialyl-Transferase kodiert
MDCK-G	<i>Madin Darby canine kidney cells</i> , zur Verfügung gestellt von Michael Winkler und Stefan Pöhlmann, DPZ Göttingen, Deutschland
MDCK-hIFITM2	wie MDCK-G, exprimieren stabil humanes IFITM2 zur Verfügung gestellt von Michael Winkler und Stefan Pöhlmann, DPZ Göttingen, Deutschland
MDCK-hIFITM3	wie MDCK-G, exprimieren stabil humanes IFITM3 zur Verfügung gestellt von Michael Winkler und Stefan Pöhlmann, DPZ Göttingen, Deutschland

A549	permanente, humane Zelllinie, alveolare basale Epithelzelllinie aus einem Adenokarzinom
Calu3	<i>Cultured human airway epithelial cells</i> , Permanente, humane Zelllinie, Epithelzelllinie aus Lungenadenokarzinom
293T	permanente, humane Zelllinie, embryonale Nierenzelllinie

2.9 Primäre Zellkulturen

HTBE	<i>Human tracheal and bronchial epithelial cells</i> , primäre Zelllinie, humane Lungenzellen aus Trachea und Bronchien, Lonza
HAEC	<i>Human alveolar epithelial cells</i> , primäre Zelllinie, humane Typ II-Pneumozyten, zur Verfügung gestellt von Susanne Herold, Justus- Liebig-Universität Gießen, Deutschland

2.10 Antikörper

Anti-Influenza-A-NP (monoklonal, Maus) [Klon 9G8] ab43821	Abcam, Cambridge, England
Anti-Maus IgG (Kaninchen), HRP-gekoppelt	DAKO, Dänemark

2.11 Mucusproben

Tabelle 2.2: Bezeichnung und Herkunft der Mucusproben

Mucusbenennung	Lot.-Nummer der HTBE-Kulturen	Herkunft
HTBE-1	AB0054	Bereitgestellt von Dr. T. Matrosovich, von HTBE-Kulturen gesammelt
HTBE-2	6F4181	
HTBE-3	5F1387	
HTBE-4	7F3833	
HNE-Mucus	-----	Bereitgestellt von Dr. T. Matrosovich, von humanen Nasenepithel (HNE)- Kulturen gesammelt
Nasaler Mucus	-----	Bereitgestellt von Dr. M. Matrosovich, durch nasale Spülungen gewonnen

2.12 Fetuine und Polymere

Tabelle 2.3: Bezeichnung der bovinen Fetuine und der Polymere, Verknüpfungstyp und Herkunft

Fetuinpräparation		Herkunft
F2379		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
F128 (HRP-gekoppelt)		Hergestellt und bereitgestellt von Dr. M. Matrosovich
F129 (HRP-gekoppelt)		
F3 (HRP-gekoppelt)		

Polymername	Glykosilierungsmuster	Herkunft
p6‘SLN	Neu5Aca2-6Galβ1-4GlcNAc	Bereitgestellt von Prof. Dr. Nicolai Bovin, Institut für Bioorganische Chemie, Moskau, Russland
p3‘SLN	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAc	
3‘SLN (biotinyliert)	Neu5Aca2-6Galβ1-4GlcNAc	
6‘SLN (biotinyliert)	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAc	

2.13 Lektine

Biotinyliertes Maackia Amurensis Lectin I (MAL I)	Vector laboratories, USA
Biotinyliertes Maackia Amurensis Lectin II (MAL II)	Vector laboratories, USA
Biotinyliertes Sambucus Nigra Lectin (SNA)	Vector laboratories, USA
HRP-Streptavidin	

2.14 Lösungen

0,3 % Triton-Lösung	Triton-X-100 (10 % Stock)	3 ml
	Glycin	0,15 g
	PBSdef	100 ml
10x TBE-Puffer	Tris Base	108 g
	Borat	55 g
	0,5M EDTA pH8,0	4 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
Ampicillin Stock-Lösung	Ampicillin	100 mg
	dH ₂ O	1 ml
Ammoniumchloridlösung (NH ₄ Cl; 1M)	NH ₄ Cl	2,67 g
	dH ₂ O	50 ml
Avicel-Stock (2,5 %)	Avicel RC-591F	12,5 g
	dH ₂ O	500 ml
ELISA-Puffer	Normal Horse Serum	10 ml
	10 % Tween 80	1 ml
	PBSdef	89 ml
Erythrozytenlösung (1 %)	Erythrozyten	1 ml
	PBSdef	99 ml
Fixierlösung (PFA)	PFA	40 g
	PBSdef	1 l
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g
	Pepton	10 g
	NaCl	5 g
	dH ₂ O	ad 1 l

Material

LB-Amp-Platten (20 Platten)	LB-Medium	200 ml
	Bacto-Agar	3 g
	NaOH (10M)	20 µl
	Ampicillin (1 mg/ml)	200 µl
Lektinlösung	NaCl (3M Stock)	5 ml
	CaCl ₂ (1M Stock)	10 µl
	MnCl ₂ (0,1M Stock)	10 µl
	MgCl ₂ (1M Stock)	10 µl
	Gelöst in Wasser	95 ml
MES-Puffer	MES (1M Stock)	50 ml
	NaCl (3M Stock)	25 ml
	CaCl ₂ (1M Stock)	450 µl
	MgCl ₂ (1M Stock)	250 µl
	H ₂ O	425 ml
NaAcetat- Puffer pH 5,5 (3M)	C ₂ H ₃ NaO ₂	24,61 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
	pH-Justierung:	Essigsäure
PBSdef	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	K ₂ HPO ₄	0,20 g
	ddH ₂ O	ad 1l
PBS ⁺⁺	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	K ₂ HPO ₄	0,20 g
	MgCl ₂	0,10 g
	CaCl ₂	0,13 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

Reaktionspuffer für	Tween 80	10 µl
Rezeptorbindungsassay	BSA-NA (5% Stock)	1 ml
	NA-Inhibitor	1 µM
	PBSdef	50 ml
TSS-Puffer	LB-Medium	85 ml
	PEG	10 g
	DMSO	5 ml
	MgCl ₂ 1M, pH 6,5	5 ml
Waschpuffer (immunhistochemische Färbung)	Tween 80 (10 %)	5 ml
	PBSdef	1 l
Waschpuffer (Bindungs-Assay)	Tween 80 (10 %)	1 ml
	PBSdef	1 l

2.15 Reaktionskits

HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland
QIAamp® viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden; Deutschland

2.16 Laborequipment

Epoch Mikroplatten Elisa-Reader	Biotek, USA
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research Pipette (1-10 µl; 20-200 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg; Deutschland
GelDoc 2000 (Gel imaging system)	Biorad, Richmond; USA
Hera Cell 150 Incubator	Heraeus Instruments, Hanau; Deutschland

Hera Safe Biosafety cabinet	Heraeus Instruments, Hanau; Deutschland
Lichtmikroskop optech Mod. 1B	Exacta + Optech GmbH, München; Deutschland
Mikrowelle	Bosch
Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau; Deutschland
NanoDrop 1000 (Photometer)	PeqLab, Erlangen; Deutschland
Optima™ L-100K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld; Deutschland
Schüttler	Kreutz, Reiskirchen; Deutschland
Spectrafuge™ Mini-Zentrifuge	Labnet International, Woodbridge; USA
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt; Deutschland
Thermo Block Dri block DB-A2	Techne, Staffordshire; UK
Wasserbad 1004	GFL, Burgwedel; Deutschland

2.17 Verbrauchsmaterialien

Combi-Tips Ritips	Ritter, Schwabmünchen; Deutschland
Cryo-Tubes (2 ml)	Corning; Niederlande
Eppendorf Reaction-Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Micro-tubes, Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht; Deutschland
Nunc-Immuno 96-well microtiter plates	Thermo Scientific, Lanenselbold; Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic, Neenah
PCR Reaction Tubes (0,2 ml)	Biozyme, Hess. Oldendorf; Deutschland
Plastikpipetten (2, 5 und 10 ml)	Greiner, Frickenhausen; Deutschland
Polypropylen Reaction Tubes (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen; Deutschland
PP-Test Tubes (5 ml)	Greiner, Frickenhausen; Deutschland
Skalpell	PfM AG, Köln; Deutschland
Single-Use pipette tips	B Braun, Melsungen; Deutschland
TipOne pipette tips	Starlab, Ahrensburg; Deutschland
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner, Frickenhausen; Deutschland
Zellkulturplatten (6, 12, 24 und 96 Vertiefungen)	Greiner, Frickenhausen; Deutschland

2.18 Software

Bioedit

ImageLab

Adobe Photoshop CS3 Extended, Version 10.0

Microsoft Office (Excel, Word, PowerPoint)

Ibis Biosciences, USA

Bio-Rad Laboratories, USA

Adobe Systems, USA

Microsoft, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolierung

Für die Sequenzierung der Influenza-Gene der rekombinanten Viren wurde die RNA der Viren isoliert. Die RNA-Isolierung aus virushaltigen Zellüberständen von MDCK-Zellen oder Allantoisflüssigkeiten wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

3.1.2 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die RT-PCR dient der Herstellung von cDNA aus viraler RNA. Die cDNA kann anschließend zur Sequenzierung (s. 3.1.5) oder zur Klonierung von Gensegmenten in Vektoren verwendet werden. Im Falle der viralen einzelsträngigen RNA wird zunächst ein Primer benötigt, der an das 3'-Ende der RNA bindet. Die reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, fügt daraufhin zur RNA komplementäre Desoxyribonukleotide an die RNA an. Der so gewonnene cDNA-Strang dient als *Template* für eine nachfolgende PCR, bei der die cDNA amplifiziert wird. Um die cDNA von der RNA zu trennen folgt ein Denaturierungsschritt. Es folgt die Annealingphase mit der Anlagerung eines Primers, der komplementär zum 3'-Ende des cDNA-Strangs ist. An diesem Primer beginnt die Elongation für einen zur cDNA komplementären DNA-Strang. Anschließend wird die DNA denaturiert und beide Primer lagern sich an je einen DNA-Strang an. In der Elongationsphase werden dann komplementäre Desoxyribonukleotide angefügt. Dadurch entstehen DNA-Doppelstränge, deren Anzahl im Verlauf der PCR-Reaktion exponentiell zunimmt.

Durchführung

Es wurde das One-Step RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. Für die vollständige Amplifikation des HAs werden die Primer HA-Bm-for und HA-Bm-rev genutzt (s. 2.2). Für die Amplifikation der NA werden die Primer NA-Bm-for und NA-Bm-rev verwendet (s. 2.2). Der RT-PCR-Ansatz wird wie folgt angesetzt:

RT-PCR-Ansatz:

RNA	6 µl
Primer (for, 20 pmol)	1,5 µl
Primer (rev, 20 pmol)	1,5 µl
Enzymmix	2 µl
dNTPs (25 µM)	2 µl
RNAse Inhibitor	0,3 µl
5x RT-Puffer	10 µl
RNAse freies H ₂ O	26,7 µl

Das folgende PCR-Programm wird für die RT-PCR verwendet:

PCR-Programm

Reverse Transkription	45°C	30 min	
Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	20 s	} 35x
<i>Primerannealing</i>	55°C	30 s	
Elongationsphase	68°C	2,5 min	
Terminale Kühlung	4°C		

Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid gefärbt. Die Genprodukte werden mittels des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt, welche durch die Firma SeqLab durchgeführt wird (s. 3.1.5).

3.1.3 Mutagenese

Die Mutagenese erlaubt es Proteine mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen aus Plasmid-DNA zu generieren. Dabei wird die Punktmutation zunächst in Plasmid-DNA eingefügt, die die genetische Information des zu mutierenden Gens enthält. Das Plasmid kann anschließend für die Transfektion genutzt werden. Durch die Wahl der Primer kann diese Mutation an den meisten Stellen innerhalb des Plasmid-Inserts eingefügt werden. Die Primer sind dabei größtenteils komplementär zur Plasmid-DNA unterscheiden sich jedoch an dem Basentriplett, welches mutiert werden muss.

Die Plasmid-DNA wird zunächst denaturiert. Dadurch können sich die Primer an die zu mutierende Stelle anlagern. Die Elongation der DNA startet bei den Primern und das ganze Plasmid wird synthetisiert. Durch mehrfaches wiederholen des Zyklus entsteht am Ende eine Mischung aus mutierter Plasmid-DNA und ursprünglicher Plasmid-DNA. Um die ursprüngliche Plasmid-DNA zu entfernen wird die DNA mit *DpnI* verdaut, welches methylierte DNA spaltet. Somit wird ausschließlich die ursprüngliche bakterielle DNA verdaut und die neu synthetisierten Plasmide verbleiben in der Probe. Diese DNA wird dann zur Transformation von Bakterien genutzt (s. 3.1.4).

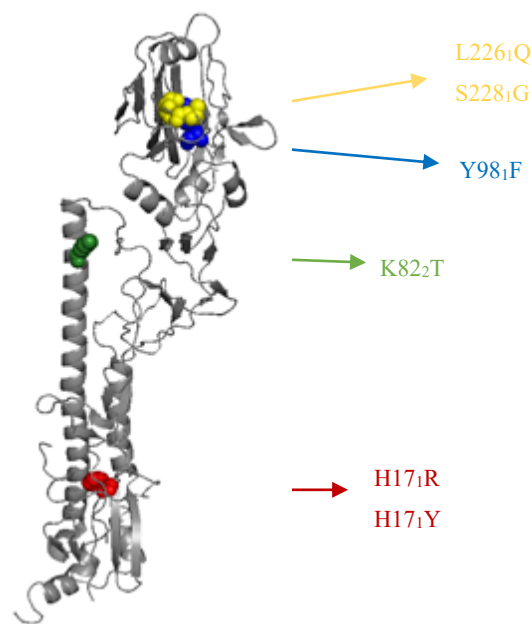


Abbildung 3.1: Hämagglutinin-Monomer von A/Hong Kong/1/1968 mit eingefügten Mutationen. Farblich markiert sind die mittels Mutagenese eingefügten Aminosäuren. Rot: Position 17_I; grün: Position 82_I; blau: Position 98_I; gelb: Positionen 226_I und 228_I (modifiziert von Struktur 4FNK, Proteindatenbank).

In dieser Arbeit wurde die Mutagenese dazu verwendet einzelne Punktmutationen in das HA des Virus A/Hong Kong/1/1968 einzufügen (s. Abb. 3.1). In das HA1 sollten die Mutationen H17_IY, H17_IR und Y98_IF eingefügt werden. Weiterhin sollte in das HA2 die Mutation K82_IT eingefügt werden.

Durchführung

Zum Einfügen der Mutationen werden die entsprechenden Primer gewählt (s. 2.2). Diese werden zusammen mit dem Plasmid pHW2000-HA (HK/68) in einem Quikchange (QC)-PCR Ansatz (s.u.) bei der PCR (s.u.) verwendet.

QC-PCR-Ansatz:

Plasmid	1 µl
Primer (for, 20 pmol)	2 µl
Primer (rev, 20 pmol)	2 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
dNTPs (10 µM)	1 µl
Phusion HF-Puffer	1 µl
H ₂ O	42,5 µl

Das folgende PCR-Programm wird für die QC-PCR verwendet:

QC-PCR-Programm

Denaturierung	98°C	1,5 min	
Denaturierung	98°C	30 s	} 16x
<i>Primerannealing</i>	60°C	20 s	
Elongationsphase	68°C	3,5 min	
Terminale Elongation	72°C	7 min	
Terminale Kühlung	4°C		

Um das ursprüngliche Plasmid aus der Probe zu entfernen, folgt auf die PCR ein *DpnI*-Verdau für 1 h bei 37°C. Die Probe wird anschließend für die Transformation von *E. coli* Bakterien verwendet (s. 3.1.4).

3.1.4 Transformation

Bei der Transformation werden Plasmide in Bakterien eingebracht um größere Mengen der Plasmid-DNA zu erhalten. Dafür werden 100 µl einer *E. coli* Übernachtskultur in 20 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C für 3 h inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2 ml TSS-Puffer resuspendiert. Die Plasmid-DNA wird zu 200 µl Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 40°C im Wasserbad für 45 s. Anschließend werden 400 µl LB-Medium (+ 1:1000 Ampicillin (1 mg/µl)) hinzugegeben und erneut bei 37°C für 1 h inkubiert. Dieser Ansatz wird anschließend auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den auf den Platten

wachsenden Kolonien werden Mini-Preps angefertigt. 4 ml LB-Medium (+ 1:1000 Ampicillin (1 mg/μl)) werden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Anschließend wird die Kultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen aus den Bakterien extrahiert. Die Plasmid-DNA wird anschließend sequenziert (s. 3.1.5). Die angeimpften Kulturen werden genutzt um eine Maxi-Präparation durchzuführen. Dafür werden 200 μl der Kultur in 200 ml LB-Medium (+ 1:1000 Ampicillin (1 mg/μl)) gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA aus der Kultur wird mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen aus den Bakterien extrahiert. Die Plasmid-Sequenz wird anschließend ebenfalls sequenziert (s. 3.1.5).

3.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung einer DNA-Sequenz. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab aus Göttingen. Die zu sequenzierenden DNA werden zusammen mit einem Primer eingeschickt und durch SeqLab sequenziert. Die Sequenzen werden mittels dem Programm BioEdit (Ibis Biosciences, USA) auf eventuelle Mutationen im Vergleich zur Ursprungs- bzw. Datenbanksequenz untersucht. Nach Analyse der Sequenzen werden Plasmide und Viren mit ungewünschten Mutationen bzw. Sequenzen verworfen.

3.2 Zellkultur

Für alle MDCK-Zelllinien sowie die A549- und Calu3-Zellen wird Wachstumsmedium (DMEM, 1 % Glutamin, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS) verwendet. Für die beiden Zelllinien MDCK-hIFITM2 und MDCK-hIFITM3 wird für die Selektion der IFITM-exprimierenden Zellen zusätzlich Puromycin (2 μg/ml) hinzugegeben. Für die Selektion der MDCK-SIAT-Zellen wird dem Wachstumsmedium Geneticin (1 mg/ml) hinzugegeben.

Falls nicht anders beschrieben, werden die Zellen (ausgesät in T75-Flaschen) zweimal mit 8 ml PBSdef gewaschen. Anschließend werden 2 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen, werden 8 ml Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wird die entsprechende Menge an Zellen für die nächste Passage oder den Versuch ausgesät.

HTBE-Kulturen sind ein Modellsystem für das tracheo-bronchiale Epithel. Diese Zellkulturen differenzieren zu zilientragenden, mucusproduzierenden und basalen Zellen aus. Die HTBE-Kulturen wurden kommerziell erworben (Lonza) und durch Dr. Tatyana Matrosovich (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) wie zuvor beschrieben kultiviert (Matrosovich et al., 2004b).

HAEC-Kulturen, bestehend aus Typ II-Pneumozyten, dienen als Modellsystem für die Alveoli. Die Zellen sind Proben einer Lobektomie, die distal von Tumoren mit Einverständnis der Patienten entnommen wurden (genehmigt durch die Ethikkommission des Instituts für Pathologie und Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die Lobektomie wurde durch Stefan Gattenloehner und Biruna Witte (beide UKGM) durchgeführt. Diese Zellen wurden auf 6,5-mm *Transwell-Clear Membrane supports* (Porengröße 0,4 μm , Corning) ausgesät. Die HAEC-Kulturen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Herold (Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

3.3 Herstellung rekombinanter Viren

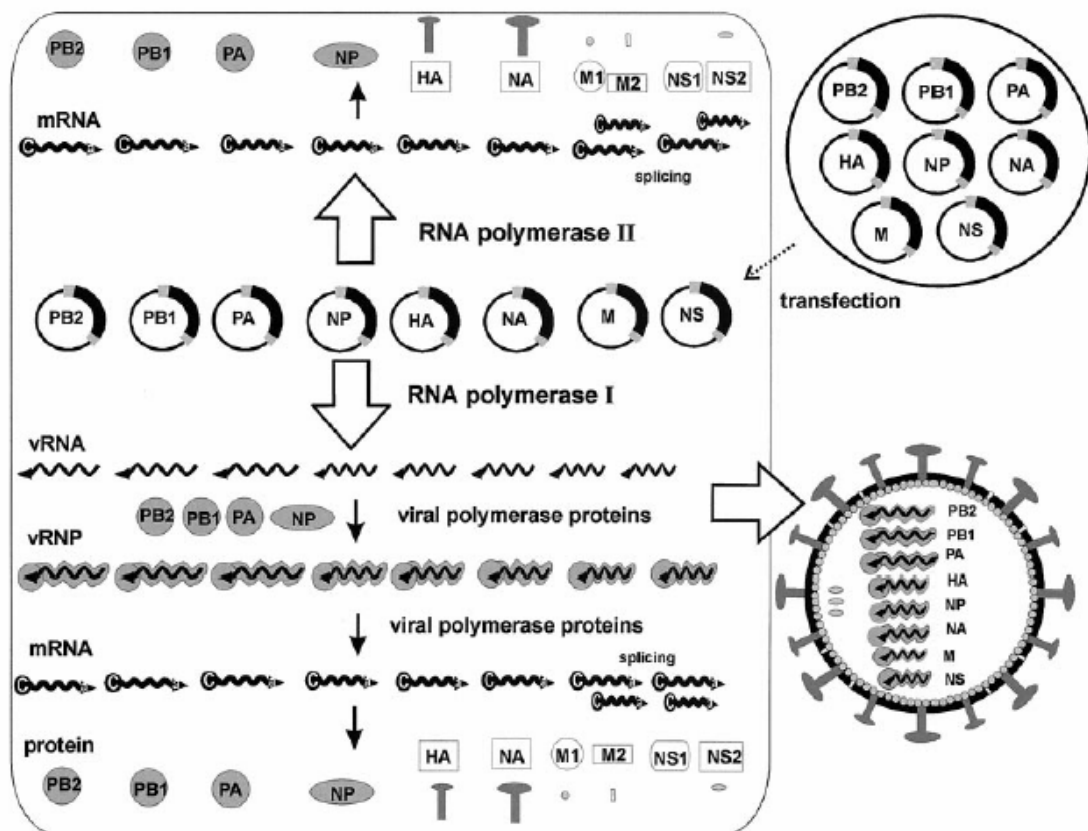


Abbildung 3.2: Prinzip des Acht-Plasmid-Systems (Hoffmann et al., 2001).

Für die Herstellung rekombinanter Viren wurde das Acht-Plasmid-System nach Hoffmann genutzt (Hoffmann et al., 2000). Dabei werden die einzelnen Gensegmente der IAV in den Vektor pHW2000 inseriert. Die Zellen werden mit den acht Plasmiden transfiziert aus denen dann die viralen Proteine und neue virale Genome entstehen. Anschließend werden aus den Genomen und den Proteinen neue Viren gebildet (s. Abb. 3.2).

Das *Insert* im pHW2000-Vektor wird durch einen RNA-Pol I- und einen RNA-Pol II-Promotor flankiert. Dabei liegt der Pol I-Promotor am 5'-Ende des *Inserts* und der Pol II-Promotor am 3'-

Ende. Dies führt zu einer zur Bildung von mRNAs durch zelluläre Polymerasen am Pol II-Promotor, aus denen dann alle viralen Proteine gebildet werden, unter anderem die viralen Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA. Am Pol I-Promotor können die viralen RNA-Polymerase-Proteine binden und vRNAs bilden. Diese vRNAs dienen der Bildung von RNP-Komplexen oder als *Template* für die erneute mRNA-Synthese aus vRNA (s. Abb. 3.2). Die neu gebildeten RNP-Komplexe und viralen Proteine dienen anschließend der Bildung von neuen Virionen.

Durch die Verwendung des rekombinanten Systems kann die Bedeutung von Genkombinationen und Einzelmutationen in Genen für die Viruseigenschaften untersucht werden.

Die Glykoproteine HA und NA der rekombinanten Viren wurden aus repräsentativen aviären, humanen und zoonotischen Viren gewonnen. Das HA- und das NA- Gen einzelner Virusisolate wurden zusammen transfiziert um die Balance aufrechtzuerhalten, die im Virusisolat vorliegt. Die verbleibenden Gene, PB1, PB2, PA, NP, NS und M stammen hingegen aus dem Laborstrang A/Puerto Rico/8/1934, wenn nicht anders beschrieben. Somit können alle Unterschiede, die zwischen den rekombinanten Viren beobachtet werden, auf die Eigenschaften des HAs und der NA und ihre Balance zurückgeführt werden.

3.3.1 Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen werden einen Tag vor der Transfektion in eine T25-Flasche so ausgesät, dass sie bei der Transfektion eine Konfluenz von mindestens 70 % aufweisen.

Für die Herstellung rekombinanter Viren werden acht pHW-Plasmide verwendet, die für die acht gewünschten Virusgenssegmente codieren. Sechs Plasmide codieren dabei für die Genssegmente PB1, PB2, PA, NP, NS und M vom Virus A/Puerto Rico/8/1934, während die Plasmide für das HA und NA aus unterschiedlichen Viren codieren (s. 2.1).

Pro Ansatz wird je 1 µg jedes Plasmids in 500 µl Opti-MEM gelöst. Weiterhin werden pro Ansatz 25 µl Lipofectamin in 500 µl für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den 5 Minuten werden die beiden Ansätze zusammengeführt und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz inkubiert für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen werden zwischenzeitlich zweimal mit PBSdef gewaschen und der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Die Zellen und der Transfektionsansatz werden für 6 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Transfektionsansatz abgenommen und durch 5 ml Infektionsmedium (DMEM, 0,1 % BSA, 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), 1 % Gln) ersetzt. Dieser Ansatz wird für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Anschließend wird der Überstand für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Dadurch werden Zellreste aus dem Überstand entfernt. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37°C mit Trypsin-TPCK (1 µg/ml) um ungespaltenes HA zu aktivieren.

3.3.2 Infektion von MDCK-Zellen

Um ausreichende Mengen an Virus zu generieren wird der HEK293-Überstand für die Infektion von MDCK-Zellen genutzt. Da die MDCK-Zellen keine HA-spaltende Protease exprimieren, werden die neu synthetisierten Viren nicht aktiviert und können keine Zellen infizieren (s. 1.4). Aus diesem Grund wird dem Zellüberstand Trypsin-TPCK zugefügt, welches das HA neu entstandener Viren spaltet. Dadurch können neu gebildete Viren weitere Zellen infizieren und die Ausbeute an Viren wird dadurch erhöht.

Durchführung

MDCK-Zellen werden am Vortag der Infektion so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion eine Konfluenz von mindestens 80 % aufweisen. Die Zellen werden zweimal mit je 8 ml PBS⁺⁺ gewaschen. Für die Infektion wird 1 ml des HEK293-Überstandes auf die Zellen gegeben. 1 h nach Infektion werden 15 ml Infektionsmedium, versetzt mit Trypsin-TPCK (1 µg/ml), hinzugegeben. Die Infektion wird für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um eine Inaktivierung der Viren durch angesäuertes Medium während der Infektion zu verhindern, wird das Medium regelmäßig mit Bicarbonat (7,5 % Stock) gepuffert. Nach der Inkubationszeit wird der Überstand für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Titer der Viren werden durch Titration mittels einzyklischer Replikation (s. 3.4.1) und Plaque-Assay (s. 3.4.2) in MDCK-Zellen bestimmt. Die Identität der Viren wird nach RNA-Isolierung (s. 3.1.1) und RT-PCR (s. 3.1.2) durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (s. 3.1.5).

3.3.3 Infektion von embryonierten Hühnereiern

Für die Infektion von Hühnereiern werden 11 Tage alte embryonierte Hühnereier verwendet. Jedes Ei wird mit 200 µl des HEK293-Überstands infiziert. Da in der Allantoishöhle eine HA-aktivierende Protease vorhanden ist, wird hier kein Trypsin-TPCK hinzugegeben. Die Eier werden anschließend bei 35°C für zwei Tage inkubiert. Danach werden sie für mindestens 1 h bei 4°C gelagert. Anschließend werden die Eier geöffnet und die klare Allantoisflüssigkeit entnommen. Die Allantoisflüssigkeit wird anschließend für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und die Allantoisflüssigkeit aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Auch hier werden die Titer der Viren durch Titration mittels einzyklischer Replikation (s. 3.4.1) und Plaque-Assay (s. 3.4.2) bestimmt. Die Identität der Viren wird durch Sanger-Sequenzierung bestimmt (s. 3.1.5).

3.4 Virusquantifizierung

3.4.1 Titration mittels einzyklischer Replikation

Bei der Titration mittels einzyklischer Replikation wird die Anzahl infektiöser Partikel in Virusproben bestimmt. Die Inkubationszeit beträgt 8 h. Dadurch wird das HA der neu synthetisierten Viren nicht gespalten wodurch es zu keiner Infektion von Nachbarzellen durch neu entstandene Viren kommt. Es werden somit nur die infektiösen Partikel der Originalprobe detektiert, die eine Zelle infizieren. Diese Viren durchlaufen lediglich einen Replikationszyklus. Der Assay wurde wie zuvor schon beschrieben durchgeführt (Matrosovich et al., 2007).

Durchführung

Die Titration wird in MDCK- und A549-Zellen durchgeführt. Von den zu titrierenden Viren wird eine 10fach-Verdünnungsreihe in Infektionsmedium (DMEM, 1 % Gln, 1 % P/S, 0,1 % BSA) hergestellt. Zellen mit einer Konfluenz von 90 % in 96-Vertiefungsplatten werden zweimal mit 100 µl/ Vertiefung PBS⁺⁺ gewaschen. Pro Vertiefung werden dann 100 µl Virusverdünnung hinzugegeben. Die Infektion wird bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 8 h nach der Infektion wird das Inoculum entfernt und die Zellen mit 4 % kaltem PFA fixiert. Im Falle der nicht-rekombinanten Viren werden die Zellen für 24 h mit 4 % PFA fixiert, da die Infektionen mit diesen Viren unter BSL3-Bedingungen stattfinden musste. Infizierte Zellen werden mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3). Der Titer wird in *Focus forming units* (FFU)/100 µl angegeben.

3.4.2 Titration mittels Plaque-Assay

Im Plaque-Assay wird die Anzahl replizierender Partikel ermittelt. Im Gegensatz zur Titration mittels einzyklischer Replikation werden hier mehrere Replikationszyklen betrachtet. Durch die Zugabe einer HA-spaltenden Protease, in diesem Falle Trypsin-TPCK, wird das HA der neu synthetisierten Viren gespalten und es kann zu einer Verbreitung der Viren auf dem Zellrasen kommen. Durch den viskosen *Overlay* können die neu synthetisierten Viren nur benachbarte Zellen infizieren und es kommt zu einer kreisförmigen Ausbreitung der Viren (s. Abb. 3.3).

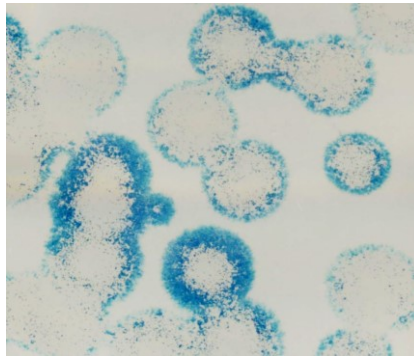


Abbildung 3.3: Immunhistochemische Färbung eines Plaqueassays des rekombinanten Virus VN-H5N1 auf MDCK-Zellen.

Durchführung

Der Plaque-Assay wurde wie zuvor schon beschrieben durchgeführt (Matrosovich et al., 2006). Von den Viren wird eine 10fach-Verdünnungsreihe in Infektionsmedium angelegt. MDCK-Zellen mit einer Konfluenz von 90% in 6-Vertiefungenplatten werden zweimal mit 2 ml/Vertiefung PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml/Vertiefung der Virusverdünnungen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Stunde nach der Infektion werden pro Vertiefung 2 ml *Overlay* (2x MEM, 1,25 % Avicel, 1,5 µg/ml Trypsin-TPCK) hinzugegeben. Die Zellen werden anschließend für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 4 % kalten PFA fixiert und infizierte Zellen werden mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP nachgewiesen (s. 3.4.3).

Um den Titer zu errechnen wird die Anzahl der Plaques bestimmt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor verrechnet. Der Titer wird in PFU/ml angegeben.

3.4.3 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung werden in dieser Arbeit infizierte Zellen detektiert um die Infektion zu quantifizieren. In zuvor permeabilisierten Zellen bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen, im Falle dieser Arbeit das virale NP-Protein. Der F_c-Teil des Primärantikörpers wird durch einen polyklonalen Sekundärantikörper gebunden. Dadurch, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, wird das finale Signal verstärkt. Durch die enzymatische Aktivität des Sekundärantikörpers werden bei Zugabe des entsprechenden Substrats infizierte Zellen blau gefärbt und können quantifiziert werden.

Durchführung

Die Immunfärbung wird wie schon vorher beschrieben durchgeführt (Matrosovic et al., 2007). Die infizierten Zellen werden mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit PBSdef gewaschen. Das PBSdef wird entfernt und es wird 0,1 % Triton zu den Zellen gegeben. 15 min nach Zugabe wird das Triton entfernt und die Zellen erneut mit PBSdef gewaschen. Der Erstantikörper (*mouse- α NP*, abcam, 1:5000 in ELISA-Puffer) wird hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden dreimal für je fünf Minuten mit Waschpuffer (PBSdef, 0,05 % Tween) gewaschen. Der Zweitantikörper (*rabbit- α -mouse*, HRP-gekoppelt, DAKO; 1:2000 in ELISA-Puffer) wird hinzugegeben und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden erneut dreimal für je 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wird das HRP-Substrat TrueBlue (KPL) hinzugegeben. Die Farbreaktion wird 30 Minuten nach Substratzugabe durch Waschen der Zellen mit Wasser abgestoppt. Anschließend werden die Platten an der Luft getrocknet. Die infizierten Zellen werden mit Hilfe eines Lichtmikroskops quantifiziert.

3.5 Viruscharakterisierung

3.5.1 Sensitivität rekombinanter Viren gegenüber niedrigem pH

Die Stabilität der Viren wird zum großen Teil durch die pH-Stabilität des HA-Proteins bestimmt, wobei auch andere virale Proteine, wie z.B. das M2-Protein, zur Stabilität beitragen können (Alvarado-Facundo et al., 2014). Dabei korreliert die pH-Stabilität mit dem Fusions-pH (zusammengefasst in Mair et al., 2014; Russell, 2014; Skehel & Wiley, 2000). Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose der Viren wird das Endosom angesäuert. Dabei untergeht das HA eine Konformationsänderung, die zur Fusion der endosomalen mit der viralen Membran führt (s. 1.4.2). Findet die Ansäuerung außerhalb der Zelle statt kommt es ebenfalls zur Konformationsänderung des HAs. Dadurch kann das HA nicht mehr den Rezeptor binden, die Rezeptor-vermittelte Endozytose wird inhibiert und die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran wird nicht induziert. Die Viren sind dadurch inaktiviert und können die Zellen nicht infizieren. Stabile Viren sind bei einem niedrigen pH noch in der Lage Zellen zu infizieren. Instabile Viren hingegen zeigen schon bei relativ hohen pH-Werten eine verringerte Infektiosität.

Durchführung

Die pH-Stabilität wurde wie zuvor schon beschrieben analysiert (Baumann et al., 2015). 20.000 FFU der Viren werden mit 250 µl MES-Puffer verschiedener pH-Werte (4,8-6) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der pH-Wert durch eine 1:100 Verdünnung der Probe in Infektionsmedium neutralisiert. MDCK-Zellen mit einer Konfluenz von 90 % werden zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und pro Vertiefung in einer 96-Vertiefungenplatte mit 100 µl der Viren infiziert und für 15 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 4 % kalten PFA fixiert und infizierte Zellen werden durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3). Als Kontrolle dient eine Infektion bei der die Viren bei einem pH-Wert von 7 inkubiert wurden. Die Infektion bei einem bestimmten pH-Wert wird anschließend in Relation zur Kontrolle gesetzt.

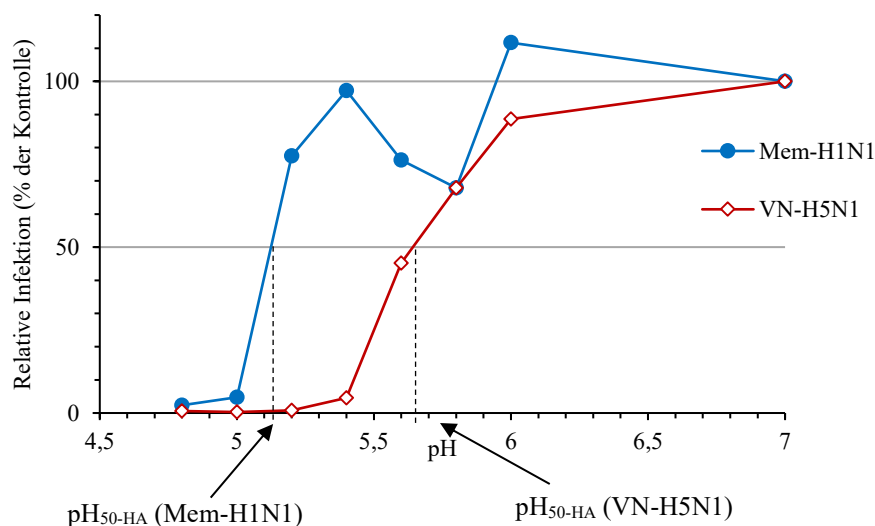


Abbildung 3.4: Bestimmung des pH_{50-HA} bei Inaktivierung der Viren durch niedrigen pH. Mittels linearer Interpolation wird der pH-Wert bestimmt, bei dem die Infektion zu 50 % reduziert ist.

Um unterschiedliche Viren zu vergleichen, wird in jedem Experiment mittels linearer Interpolation der pH-Wert bestimmt, bei dem 50 % der Zellen infiziert werden (pH_{50-HA}) (s. Abb. 3.4). Aus den einzelnen Werten aller Experimente werden danach der Mittelwert sowie das Konfidenzintervall berechnet. Die statistische Auswertung erfolgt wie in 3.7 beschrieben.

3.5.2 Inhibition der Infektion durch Ammoniumchlorid

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) ist eine membrangängige, lysomotrophe Substanz, die konzentrationsabhängig eine Ansäuerung des endosomal pHs verhindert (Maxfield, 1982). Das Produkt der Hydrolyse, NH₄OH akkumuliert dabei in den Endosomen und fängt freie Protonen ab. Dadurch kann die Infektion von IAV dosisabhängig inhibiert werden, da der für die HA-induzierte Fusion benötigte pH nicht erreicht wird (Krenn et al., 2011).

Die Infektion von Viren, welche bei einem hohen Fusions-pH im Endosom fusionieren, wird bei hohen Konzentrationen von NH_4Cl inhibiert. Die Infektion von Viren, welche bei einem niedrigem Fusions-pH im Endosom fusionieren, wird hingegen schon bei niedrigen Konzentrationen von NH_4Cl inhibiert (s. Abb. 3.5) (White, Matlin und Helenius, 1981).

Durchführung

Um die Virussensitivität gegenüber NH_4Cl zu überprüfen wurde der Versuch wie zuvor beschrieben durchgeführt (Baumann et al., 2015). 200 FFU/100 μl werden mit verschiedenen Konzentrationen NH_4Cl (Stammlösung 100 mM) inkubiert. MDCK-Zellen (90 % Konfluenz) in 96-Vertiefungenplatten werden zweimal mit PBS^{++} gewaschen und anschließend mit 100 μl der Virus/ NH_4Cl -Gemische infiziert. 15 h nach der Infektion werden die Zellen mit 4 % kaltem PFA fixiert und infizierte Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3).

Die Virusverdünnungen der nicht-rekombinanten Viren werden hergestellt und auf die mit NH_4Cl stimulierten Zellen gegeben. Um eine multizyklische Replikation der Viren zu verhindern erfolgt die Infektion über 8 h. Anschließend werden die Zellen für 24 h mit 4 % PFA fixiert. Daraufhin erfolgt die Detektion infizierter Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP (s. 3.4.3).

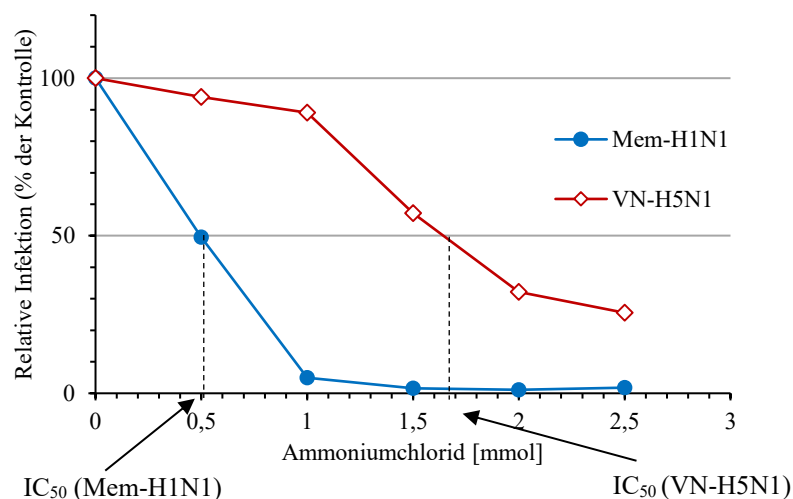


Abbildung 3.5: Bestimmung der IC_{50} bei der Inhibition der Infektion durch NH_4Cl . Mittels linearer Interpolation wird die Konzentration NH_4Cl bestimmt, bei der die Infektion zu 50 % reduziert ist (IC_{50}).

Die Anzahl infizierter Zellen in Anwesenheit von NH_4Cl wird in Relation zur Kontrollinfektion, Infektion ohne NH_4Cl , gesetzt (s. Abb. 3.5). Zum Vergleich der Viren wird in jedem Experiment mittels linearer Interpolation die NH_4Cl -Konzentration bestimmt, bei der es zu einer 50 %igen Inhibition kommt (IC_{50}) (s. Abb. 3.5). Aus den einzelnen Werten aller Experimente werden der

Mittelwert sowie das Konfidenzintervall ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgt wie in 3.7 beschrieben.

3.5.3 Detektion der pH-abhängigen Konformationsänderung im HA

In diesem Versuch wird die Konformationsänderung des HAs detektiert. Dafür werden Viren auf einer mit Fetuin beschichteten Platte immobilisiert. Durch die Zugabe von pH-Puffern ändert das HA seine Konformation, was das HA sensitiv gegenüber proteosomalen Abbau macht (Steinhauer et al., 1991). Die HAs, die die Konformation geändert haben, können nach einer Proteasebehandlung keine Rezeptoren mehr binden. Durch Zugabe von HRP-gekoppeltem Fetuin, welches durch jedes HA gebunden werden kann, werden die HAs detektiert, die keine Konformationsänderung durchlaufen haben. Die Absorption nimmt bei vermehrter Konformationsänderung ab, was man anhand einer verringerten Absorption nachweisen kann. Viren, die bei einem hohen Fusions-pH fusionieren, zeigen somit bei hohen pH-Werten eine verringerte Absorption. Viren, die bei einem niedrigen Fusions-pH fusionieren, zeigen entsprechend erst bei niedrigeren pH-Werten eine verringerte Absorption (s. Abb. 3.6).

Durchführung

Die Detektion der Konformationsänderung wird wie zuvor schon beschrieben durchgeführt (van Poucke et al., 2015). Mit Fetuin beschichtete ELISA-Platten (96 Vertiefungen) werden mit 50 µl/Vertiefung Virus bei 4°C für 15 h inkubiert. Die Virusverdünnungen wurden vorher mittels *Scatchard-plot* ermittelt (3.5.7.1). Die Virusverdünnung wird abgenommen und die Platten einmal mit 100 µl/Vertiefung PBSdef gewaschen. Anschließend werden die Platten mit 100 µl/Vertiefung Block-Lösung (0,1% NA-behandeltes BSA in PBSdef) für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Blocklösung wird abgenommen und die Platte mit kaltem PBSdef gewaschen. Die Viren werden mit NaAc-Puffern mit unterschiedlichem pH-Werten für 15 min bei 4°C inkubiert. Die pH-Puffer werden abgenommen und die Viren mit Proteinase K bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend werden die Viren dreimal mit Waschpuffer (0,01% Tween in PBSdef) gewaschen. Anschließend werden 50 µl/Vertiefung HRP-gekoppeltes Fetuin für 1 h bei 4°C zu den Viren gegeben. Die Verdünnung des Fetuins wurde zuvor bestimmt (s. 3.5.7.2). Es folgen fünf Waschschritte mit Waschpuffer (100 µl; 200 µl; 300 µl; 400 µl; 300 µl). Gebundenes Fetuin wird durch Zugabe des HRP-Substrats TMB (100 µl/ Vertiefung) detektiert. Die Färbung wird durch Zugabe von 50 µl/ Vertiefung Schwefelsäure (5% H₂SO₄ in H₂O) abgestoppt. Die Absorption wird im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die gemessene Absorption bei unterschiedlichen pH-Werten wird in Relation zur gemessenen Absorption von Viren gesetzt, die bei einem pH von 7 inkubiert wurden (s. Abb. 3.6). Zum Vergleich unterschiedlicher Viren werden für jedes Experiment mittels linearer Interpolation der pH-Wert bestimmt bei dem 50% der Absorption noch vorhanden ist (pH_{50}) (s. Abb. 3.6). Aus den Replikaten aller Experimente werden anschließend Mittelwerte und Konfidenzintervalle berechnet. Die statistische Auswertung erfolgt wie in 3.7 beschrieben.

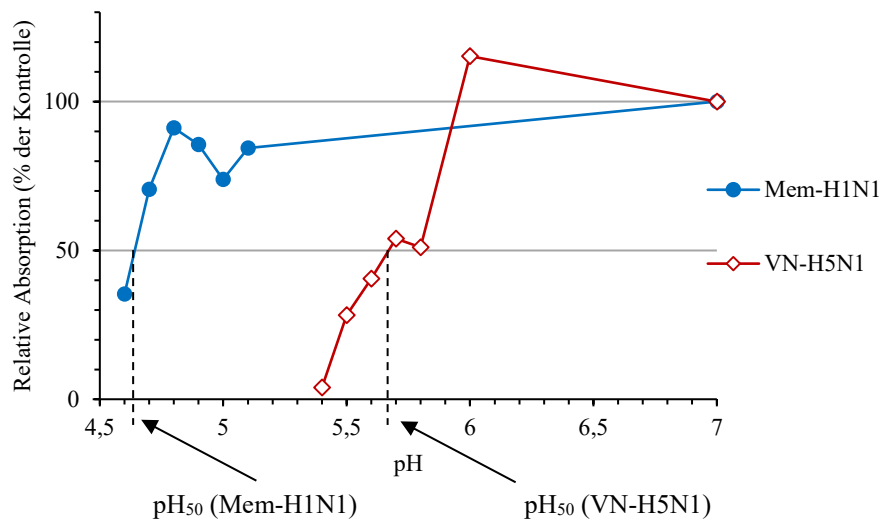


Abbildung 3.6: Bestimmung des pH_{50} bei der pH-induzierten Reduktion der Absorption. Mittels linearer Interpolation wird der pH-Wert bestimmt, bei dem die Absorption zu 50 % reduziert ist.

3.5.4 Virusreplikation in verschiedenen Modellsystem der humanen Atemwege

Es wird angenommen, dass humane Viren hauptsächlich den Respirationstrakt in der Trachea und den Bronchien infizieren. Aviäre Viren hingegen sollen hauptsächlich im unteren Respirationstrakt, wie zum Beispiel den Alveoli, replizieren (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2010). Um die Abhängigkeit des Replikationsverhaltens von IAV von HA und NA im Menschen näher zu untersuchen, wurden Wachstumskinetiken in verschiedenen Zellsystemen humaner Atemwegszellen durchgeführt. Dafür wurden Calu3-Zellen, Kulturen humaner tracheobronchialer Epithelzellen (HTBE-) sowie humane alveolare Epithelzellen (HAEC) verwendet. Die zuletzt genannten sind primäre Zellen, die zum einen das tracheo-bronchiale Epithel des Respirationstraktes (HTBE) und zum anderen das Epithel der Alveoli modellieren sollen (HAEC). Im Gegensatz zu anderen Zellsystemen, wie z.B. A549-Zellen, sind diese drei Zellsysteme in der Lage das HA von neu synthetisierten Viren zu spalten und somit eine multizyklische Replikation der rekombinanten Viren zu ermöglichen.

3.5.4.1 Replikation in HTBE-Kulturen

HTBE-Kulturen werden unter einem *air-liquid interface* (ALI) kultiviert. Dies bedeutet, dass die Zellen nur von der basolateralen Seite der Filter mit Medium inkubiert werden während die apikale Seite kein Medium erhält. Dadurch differenzieren sich die Zellen in zilierte Zellen, mucusproduzierende Zellen und basale Zellen aus. Auf den Zellen wird apikal Mucus sezerniert. Diese Zellen wurden von Dr. Tatyana Matrosovich, wie zuvor beschrieben, auf Filtern ausgesät und zur Verfügung gestellt (Matrosovich et al., 2004b).

Durchführung

Die HTBE-Kulturen werden fünfmal mit PBSdef gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 400 PFU/Filter infiziert. Eine Stunde nach der Infektion wird das Inoculum entfernt und die Zellen für 96 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Entnehmen der Virus-enthaltenden Proben werden alle 24 h 300 µl Infektionsmedium (DMEM, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,1% BSA) auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Diese 300 µl werden als Probe entnommen und bei -80°C gelagert. Nach 96 h werden die HTBE-Kulturen mit 4% PFA fixiert. Die Virus-Titer der Proben werden mittels einzyklischer Replikation auf MDCK-Zellen bestimmt (s. 3.4.1).

3.5.4.2 Replikation in HAEC-Kulturen

HAEC-Kulturen sind primäre humane Typ II-Pneumozyten. Sie sind ein Modellsystem für das alveolare Epithel. Diese Zellen wurden auf 6,5-nm *Transwell-Clear Membrane supports* (Porengröße 0,4 µm, Corning) ausgesät und von unseren Kooperationspartner Prof. Susanne Herold (Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt.

Durchführung

Die Zellen werden zweimal mit PBSdef gewaschen. Die Infektion erfolgt mit 4000 PFU/Filter. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für 2 h. Das Inoculum wird entfernt und frisches Medium (200 µl) auf die Zellen gegeben. Das Wachstum der Viren wird über einen Zeitraum von 96 h beobachtet. Alle 24 h wird der komplette Überstand (200 µl) entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Der Überstand wird bei -80°C gelagert. Die Titer der Proben werden mittels einzyklischer Replikation auf MDCK-Zellen bestimmt (s. 3.4.1).

3.5.4.3 Replikation in Calu3-Zellen

Calu3-Zellen sind eine permanente Laborzelllinie, die der humanen Lunge entstammt. Sie dient ebenfalls als ein Modellsystem für die Replikation der rekombinanten Viren im Respirationstrakt.

Durchführung

Calu3-Zellen (90% Konfluenz, 24-Vertiefungenplatten) werden vor der Infektion zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert. Das Inoculum wird eine Stunde nach der Infektion durch 800 µl frisches Infektionsmedium ersetzt. Das Wachstum wird über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Alle 24 h wird eine Probe des Überstandes (100 µl) entnommen und der Titer mittels einzyklischer Replikation auf MDCK-Zellen bestimmt (s. 3.4.1).

3.5.5 Virusinhibition durch bronchialen Mucus in verschiedenen Zellsystemen

Mucus wird in den Atemwegen produziert und auf die Zelloberfläche sezerniert. Der Effekt des Mucus auf die Infektion von IAV kann durch Untersuchung der Virusinhibition bestimmt werden. Dabei wird die Infektion in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen Mucus durchgeführt. Die inhibitorische Wirkung auf die Infektion kann dann anhand einer verringerten Infektion nachgewiesen werden. Der in diesen Versuchen verwendete Mucus wurde von HTBE-Kulturen gewonnen. Des Weiteren wurden eine Probe von HNE-Kulturen, einem Modellsystem für das nasale Epithel, und eine Mucusprobe eines Probanden aus dem nasalen Epithel verwendet (s. 2.11).

Durchführung

MDCK-Zellen sowie SIAT-Zellen (90% Konfluenz, 96-Vertiefungenplatten) werden vor der Infektion zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und es werden 50 µl/Vertiefung Infektionsmedium hinzugegeben. Es wird eine Verdünnungsreihe vom Mucus in Infektionsmedium angesetzt (finale Verdünnungen: 1:16 – 1:1024). Anschließend werden pro 100 µl Mucusverdünnung 100 µl einer Virusverdünnung (800 FFU/100 µl) hinzugegeben. Von dieser Verdünnung werden 50 µl/Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ für 8 h inkubiert. Die Zellen werden fixiert und infizierte Zellen werden mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3).

90%-konfluente Calu3-Zellen in 24-Vertiefungenplatten werden zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Im Vergleich zum Versuch in MDCK-Zellen werden bei den Calu3-Zellen 150 µl/ Vertiefung des

Infektionsmedium vorgelegt und anschließend mit 150 µl/ Vertiefung des Mucus/Virus-Gemischs infiziert.

Für Inhibitionsstudien in HTBE-Kulturen wird zunächst der Mucus der HTBE-Kulturen entnommen. Dieser Mucus dient anschließend als Probe. Anschließend werden die HTBE-Kulturen 10-mal mit 300 µl PBS⁺⁺ gewaschen. Für die Infektion der HTBE-Kulturen werden 2000 FFU der Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1 in 500 µl unverdünntem Mucus aus den entsprechenden HTBE-Kulturen verdünnt. Als Kontrolle werden 2000 FFU Virus in Infektionsmedium verdünnt. Gleichzeitig werden MDCK-Zellen mit 200 FFU der Viren in Anwesenheit von Mucus in einer Verdünnung von 1:40 infiziert. Die Infektion wird nach 8 h abgestoppt und infizierte Zellen werden mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP-Protein detektiert (s. 3.4.3).

Um die Sensitivität verschiedener Viren gegenüber Mucus zu vergleichen wird die Anzahl infizierter Zellen in Anwesenheit von Mucus in Relation zur Anzahl infizierter Zellen in Abwesenheit von Mucus gebracht. Die statistische Auswertung erfolgt wie in 3.7 beschrieben.

3.5.5.1 Einfluss der NA auf die Virusneutralisation durch Mucus: NA-Aktivität

Unterschiede in der Spaltungseffizienz von Sialinsäuren, vermittelt durch die NA, können zu einer unterschiedlichen Infektionseffizienz in Anwesenheit von Mucus führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der NA-Inhibitor Oseltamivircarboxylat (OC) genutzt. Dieses Sialinsäure-Analog hemmt kompetitiv die NA-Aktivität. Bei gehemmter NA wird erwartet, dass die Inhibition durch den Mucus verstärkt wird. Sollte die inhibitorische Wirkung des Mucus ausschließlich abhängig von der NA-Aktivität sein, sollte die Inhibition bei gehemmter NA zwischen Viren vergleichbar sein.

Durchführung

Der Neutralisationsassay wird wie in 3.5.5 für MDCK-Zellen beschrieben durchgeführt. Vor der Infektion wird OC in einer Konzentration von 1 µM zu den Viren gegeben. Als Kontrolle dient die Virusneutralisation ohne Mucus in Anwesenheit von OC. Parallel dazu wird ein Neutralisationsassay ohne OC durchgeführt.

Um die Sensitivität verschiedener Viren gegenüber Mucus zu vergleichen wird die Anzahl infizierter Zellen in Anwesenheit von Mucus in Relation zur Anzahl infizierter Zellen in Abwesenheit von Mucus gebracht.

3.5.6 Bindungsaffinität in MDCK-Zellen

In diesem Versuch wird die Bindungsaffinität der Viren in MDCK-Zellen verglichen. Die NA von *V. cholerae* spaltet terminale Sialinsäuren und somit den Rezeptor von IAV ab. Inkubiert man Zellen mit der NA von *V. cholerae*, so wird die Infektion von IAV aufgrund der fehlenden Rezeptoren inhibiert. Dabei wird die Infektion von Viren, die stark an ihren Rezeptor binden weniger stark beeinflusst als die Infektion von Viren, die schwach an ihren Rezeptor binden.

Durchführung

Es wird eine 1:4 Verdünnungsreihe der NA von *V. cholerae* angelegt, ausgehend von einer Konzentration von 43,2 mU NA. Pro Vertiefung einer 96-Vertiefungen-Platte werden 50 µl dieser NA-Verdünnung zu den MDCK-Zellen (90% Konfluenz) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden zu den Zellen 200 FFU/ Vertiefung in 50 µl gegeben. 15 h nach der Infektion werden die Zellen mit 4% PFA fixiert und infizierte Zellen werden mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3). Als Kontrolle dient in diesem Versuch die Infektion von unbehandelten Zellen. Die Infektion der Zellen, die mit NA vorbehandelt wurden, wird in Relation zur Kontrollinfektion, Inkubation der Zellen ohne NA von *V. cholerae*, gesetzt.

3.5.7 Solid-Phase Fetuin binding Assays

Die folgenden Versuche dienen der Bestimmung der Rezeptorbindung von IAV. Mit Hilfe dieses Assays kann man Bindungspartner von IAV bestimmen, die z.B. im Mucus enthalten sind (s. 3.5.7.3). Auch kann man mit Hilfe von Polymeren oder Fetuinen mit definierten Sialinsäurestrukturen die Rezeptorspezifität sowie die Bindungsstärke der IAV detektieren (s. 3.5.7.2). Um diese Versuche durchführen zu können, müssen zunächst die optimale Virusverdünnung (s. 3.5.7.1) und die optimale Fetuinkonzentration (s. 3.5.7.2) bestimmt werden. Dabei wird dieser Versuch wie zuvor beschrieben durchgeführt (Gambaryan und Matrosovich, 1992; Matrosovich und Gambaryan, 2012).

Für eine effizientere Bindung von IAV an ELISA-Platten werden diese mit Fetuin beschichtet. Fetuin ist ein bovines Protein, welches humane und aviäre Rezeptoren besitzt und durch IAV gebunden werden kann.

3.5.7.1 Bestimmung der optimalen Virusverdünnung

Es wird eine 2-fach Verdünnungsreihe der Viren in PBSdef angelegt. Die mit Fetuin beschichteten Platten werden für 15 h bei 4°C mit je 50 µl/Vertiefung der Virusverdünnungen inkubiert. Nach der Inkubation wird der Überstand entfernt und die Platte wird einmal mit kaltem PBSdef gewaschen. Anschließend werden die Platten mit 100 µl/Vertiefung Blocklösung (PBSdef, 0,1% NA-behandeltes BSA) für 1 h bei 4°C geblockt. Danach wird die Blocklösung abgenommen und es wird für 1 h bei 4°C HRP-gekoppeltes Fetuin (1:1000 in Reaktionspuffer) auf die Platten gegeben (50 µl/Vertiefung). Das Fetuin wird entfernt und die Platte wird fünfmal mit ansteigender Menge Waschpuffer (100 µl; 200 µl; 300 µl; 400 µl; 300 µl) gewaschen. Gebundenes Fetuin wird durch die Zugabe des HRP-Substrats TMB (100 µl/Vertiefung) detektiert. Die Färbereaktion wird durch die Zugabe Schwefelsäure (5%) abgestoppt (50 µl/Vertiefung). Die Messung der Absorption erfolgt im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die Absorption wird gegen die Virusverdünnung aufgetragen. Dabei nimmt die Absorption mit steigender Verdünnung ab. Zu Beginn der Kurve, bei niedrigen Verdünnungen, existiert jedoch ein Plateau. Die optimale Virusverdünnung ergibt sich aus dem Verlauf der Absorptionskurve. Es wird die höchste Verdünnung verwendet, bei der die Absorption noch gesättigt vorliegt (Plateau) (Matrosovich and Gambaryan, 2012).

3.5.7.2 Direkter Fetuin-Bindungs-Assay

Bei dem direkten Bindungsassay wird die Bindung der Viren an Bindungspartner untersucht. Dabei können die Bindungspartner sowohl Fetuine als auch spezifische Rezeptoranaloga sein. Mit Hilfe dieses Assays kann die Bindungsstärke durch die Berechnung der Affinitätskonstante (K_{aff}) ermittelt werden. Als Rezeptoranaloga dienen HRP-gekoppelte Polymere, an die die entsprechenden Zuckerketten auf der Oberfläche gekoppelt sind. In dieser Arbeit dienen das Polymer 3'SLN als Analog für α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren und das Polymer 6'SLN als Analog für α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren (s. 2.12).

Durchführung

Auf mit Fetuin beschichteten Platten wird die vorher bestimmte optimale Virusverdünnung aufgetragen (s. 3.5.7.1). Die Platten werden für 15 h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Virus wird durch das Waschen mit kaltem PBSdef entfernt. Anschließend werden die Platten mit 100 µl/Vertiefung Blocklösung (PBSdef, 0,1% NA-behandeltes BSA) für 1 h bei 4°C inkubiert um potentielle freie Bindungsstellen abzusättigen. Es wird eine 2-fach Verdünnungsreihe des HRP-gekoppelten Fetuins bzw. des biotinylierten Polymers in Reaktionspuffer angelegt (beginnend bei

1:1000). Die Blocklösung wird abgenommen und das Fetuin wird auf die Platten gegeben (50 µl/Vertiefung) und für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Bindungspartner wird entfernt und die Platte wird fünfmal mit Waschpuffer gewaschen (100 µl; 200 µl; 300 µl; 400 µl; 300 µl). Im Falle der Polymere werden 50 µl pro Vertiefung eines HRP-gekoppeltes Streptavidins (1:400 in Reaktionspuffer) hinzugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird nicht gebundenes Streptavidin durch mehrmaliges Waschen (s.o.) entfernt. Gebundene Fetuine bzw. gebundenes Streptavidin werden durch die Zugabe des HRP-Substrats TMB (100 µl/Vertiefung) detektiert. Die Färbereaktion wird durch die Zugabe Schwefelsäure (5%) nach 30 min abgestoppt (50 µl/Vertiefung). Die Messung der Absorption erfolgt im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Aus diesen Daten werden *Scatchard-plots* erstellt (s. Abb. 3.7) indem der Quotient aus Absorption und Konzentration (A/C) gegen die Absorption aufgetragen wird (Matrosovich und Gambaryan, 2012). Dies dient der Bestimmung der Affinitätskonstanten K_{aff} , die ein Maß für die Affinität der Viren an den Bindungspartner ist. Je größer K_{aff} ist, desto größer ist die Bindungsstärke. K_{aff} ergibt sich aus dem Quotienten der beiden Achsenabschnitte:

$$K_{\text{aff}} = \frac{A/C_{\text{max}}}{A_{\text{max}}}$$

Dabei stellen A/C_{max} den Y-Achsenabschnitt und A_{max} die maximale Absorption dar (s. Abb. 3.7). Diese Konstante wird zum Vergleich der Bindungsstärke der rekombinanten Viren herangezogen. Anhand dieser Graphen lässt sich zudem die optimale Fetuinverdünnung für den Fetuin-Inhibitionsassay bestimmen, welche bei halbmaximaler Absorption vorliegt ($A_{\text{max}0,5}$, s. Abb. 3.7).

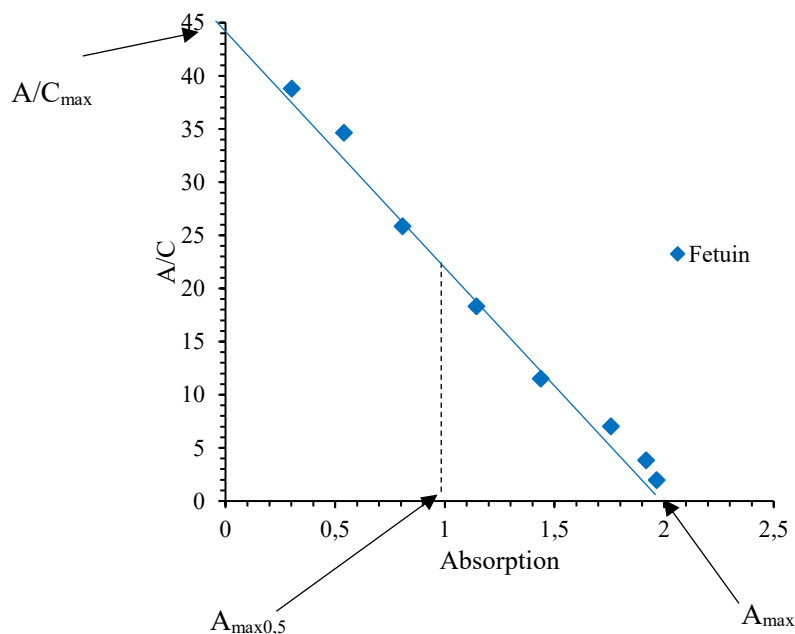


Abbildung 3.7: *Scatchard-Plot* der direkten Bindung von Fetuin für das Virus mal-H1N1.

3.5.7.3 Kompetitiver Bindungsassay

Im Gegensatz zum direkten Bindungsassay wird in diesem Experiment die Bindung an Bindungspartner bestimmt, indem man die inhibitorische Wirkung der Analoga auf die Bindung eines HRP-gekoppelten Influenza-Bindungspartners untersucht. Das Prinzip beruht auf der kompetitiven Inhibition zwischen HRP-Fetuin und dem potentiellen Inhibitor. Je stärker die Bindung an den Inhibitor, desto geringer wird die gemessene Absorption. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuch dafür verwendet die Inhibitoren im Mucus näher zu untersuchen.

Durchführung

Auf mit Fetuin beschichteten Platten wird die vorher bestimmte Virusverdünnung aufgetragen (s. 3.5.7.1). Die Platten werden für 15 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wird das Virus entfernt und die Platte wird einmal mit kaltem PBSdef gewaschen. Anschließend werden die Platten mit 100 µl/Vertiefung Blocklösung (PBSdef, 0,1% NA-behandeltes BSA) für 1 h bei 4°C inkubiert um potentielle freie Bindungsstellen abzusättigen. Die vorher bestimmte optimale Menge an Fetuin (s. 3.5.7.2) wird mit Mucus gemischt. Als Kontrolle werden die beiden nicht-markierten Polymere p3'SLN und p6'SLN als Inhibitoren verwendet (s. 2.12). Die Blocklösung wird entfernt und das Mucus/Fetuingemisch aufgetragen (50 µl/Vertiefung). Nach 1 h Inkubation bei 4°C wird das Fetuingemisch verworfen und die Platten werden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen (100 µl; 200 µl; 300 µl; 400 µl; 300 µl). Gebundenes Fetuin wird durch die Zugabe des HRP-Substrats TMB detektiert. Die Färbungsreaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure (5%) nach 30 min abgestoppt. Die Absorption wird im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Absorption in Anwesenheit von Mucus wird in Relation zur Absorption in Abwesenheit von Mucus gesetzt. Dieser Quotient wird gegen die Mucusverdünnung aufgetragen.

3.5.8 Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob das HA und/ oder die NA einen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status haben. Dafür wurden verschiedene Zelltypen mit IFN- β stimuliert und anschließend infiziert. Zunächst wurde die Sensitivität der Viren gegenüber humanen, durch IFN- β -induzierte, Effektormolekülen während des Viruseintritts untersucht, da gerade in dieser frühen Infektionsphase das HA und die NA einen entscheidenden Einfluss haben können. Dazu wird eine Abwandlung der Titration mittels einzyklischer Replikation genutzt (s. 3.4.1).

3.5.8.1 Virusinhibition durch IFN- β -induzierte Effektormoleküle beim Viruseintritt in A549- und Calu3-Zellen

Zunächst wurde die Virussensitivität gegenüber IFN in A549- und Calu3-Zellen getestet, da diese Zelllinien aus dem humanen Respirationstrakt sind. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass sie bei Stimulation mit IFN eine antivirale Antwort aufbauen.

Durchführung

IFN- β (Stock: $8 \cdot 10^6$ U/ml) wird in Wachstumsmedium verdünnt (1 U, 10 U, 100 U, 100 U) und zu 90% konfluente A549-Zellen in 96-Vertiefungenplatten gegeben. Diese werden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Nach einem Waschschrift mit PBS⁺⁺ werden die Zellen mit 200 FFU/Vertiefung, verdünnt in Infektionsmedium, infiziert. 8 h nach der Infektion werden die Zellen mit 4% kalten PFA fixiert. Infizierte Zellen werden mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3). Die Infektion in stimulierten Zellen wird in Relation zur Infektion in unstimulierten Zellen gesetzt. Für die nicht-rekombinanten Viren wird dieses Protokoll leicht abgeändert, da die Infektion unter BSL3-Bedingungen stattfinden muss. Die Zellen werden wie bereits beschrieben mit IFN- β vorbehandelt, jedoch werden die Zellen nach der Infektion für 24 h mit 4% PFA fixiert. Der Nachweis infizierter Zellen erfolgt wie zuvor beschrieben (s. 3.4.3).

Calu3-Zellen werden in 24-Vertiefungenplatten ausgesät. 24 h vor der Infektion werden die Zellen (90% Konfluenz) mit IFN- β stimuliert. Die Zellen werden mit 400 FFU/Vertiefung infiziert. 8 h nach der Infektion werden die Zellen fixiert und infizierte Zellen werden durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3).

3.5.8.2 Virusinhibition durch IFN- β -induzierte Effektormoleküle in HAEC- und HTBE-Kulturen

Da A549- und Calu3-Zellen permanente Zelllinien sind sollte ebenfalls untersucht werden, ob die in diesen Zelllinien beobachteten Effekte auch in primären Zellen des Respirationstraktes, wie HTBE- und HAEC-Kulturen, reproduziert werden können. Primäre Typ II-Pneumozyten wurden wie zuvor beschrieben von Patienten gewonnen und auf Filter-Inserts ausgesät (s. 3.5.4.2). Diese Zellen wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Susanne Herold (Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Die HTBE-Kulturen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (s. 3.5.4.1) und von Dr. Tatyana Matrosovich (Philipps-Universität Marburg) auf Filtern ausgesät und kultiviert.

Die Experimente zur Sensitivität von IAV gegenüber IFN- β in HTBE- und HAEC-Kulturen wurden von Dr. Tatyana Matrosovich durchgeführt.

Durchführung

HTBE-Kulturen werden von der basolateralen Seite 24 h vor der Infektion mit 20 U/ml IFN- β stimuliert, welches zum gewechselten Wachstumsmedium zugefügt wird. Anschließend werden die HTBE-Kulturen von der apikalen Seite mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 60.000 FFU, basierend auf dem MDCK-Titer, in 200 μ l Wachstumsmedium von der apikalen Seite infiziert. 1 h nach Zugabe der Viren, wird das Inoculum entfernt und die Kulturen für weitere 7 h bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert.

HAEC-Kulturen werden ebenfalls 24 h vor der Infektion mit 2 U/ml oder 20 U/ml IFN- β sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite her inkubiert. Anschließend werden die Zellen von der apikalen Seite mit 20.000 FFU Virus pro Filter infiziert. Die Kulturen werden für 8 h bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert.

Sowohl in HTBE- als auch in HAEC-Kulturen werden infizierte Zellen mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP detektiert (s. 3.4.3).

3.5.8.3 Replikation von Viren in Anwesenheit von IFN- β

In diesem Versuch soll untersucht werden inwieweit das HA und NA die Sensitivität der Viren gegenüber IFN- β über einen längeren Infektionszeitraum beeinflussen können. Während die zuvor beschriebenen Versuche ausschließlich den Viruseintritt untersuchen (s. 3.5.8.1) werden hier die kombinierten Effekte aus Viruseintritt, Virusknospung und Replikation untersucht. Dadurch wird auch beobachtet inwiefern die beiden Glykoproteine mit IFN-induzierten Effektmolekülen, die spätere Phasen der Replikation inhibieren, interagieren. Dafür wurden die Zellen über den ganzen Replikationszeitraum mit IFN- β stimuliert.

Durchführung

Calu3-Zellen (90% Konfluenz) in 24-Vertiefungenplatten werden 24 h Stunden vor der Infektion mit humanem IFN- β (0 U, 10 U, 100 U, 1000 U pro Vertiefung) bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Anschließend werden die Zellen mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit einer MOI von 0,01 mit den rekombinanten Viren für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Das Inoculum wird entfernt und 800 μ l Infektionsmedium versetzt mit IFN- β (0 U, 10 U, 100 U, 1000 U) hinzugegeben. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ für 72 h inkubiert. Alle 24 h werden 100 μ l Probe entnommen. Als Kontrolle dient das Wachstum der rekombinanten Viren in unstimulierten Zellen. Die Virustiter dieser Proben werden mittels einzyklischer Replikation auf MDCK-Zellen bestimmt (s. 3.4.1).

3.5.9 Virusinhibition durch humanes IFITM2 und IFITM3

IFITM-Proteine sind IFN-stimulierte Genprodukte, die die virale Fusion an der Zellmembran und im Endosom inhibieren können. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit war es von besonderem Interesse IFN-stimulierte Effektormoleküle zu untersuchen, die die virale Fusion inhibieren.

Die Sensitivität der rekombinanten Viren gegenüber humanem IFITM2 und IFITM3 wurde in dieser Arbeit durch die Infektion von MDCK-Zellen überprüft, die das humane IFITM2 bzw. das humane IFITM3 stabil exprimieren. Diese Zellen wurden von unseren Kooperationspartnern Dr. Michael Winkler und Dr. Stefan Pöhlmann (beide DPZ Göttingen) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle dient die ursprüngliche untransfizierte MDCK-Zelllinie, MDCK-G.

Durchführung

Die Replikationseffizienz der Viren wird mit Hilfe der einzyklischen Replikation (s. 3.4.1) und des Plaque-Assays (s. 3.4.2) in IFITM2- und IFITM3-exprimierenden Zellen überprüft. Dabei wird der Titer nach einzyklischer Replikation bestimmt um den Einfluss der IFITM-Proteine auf den viralen Zelleintritt zu untersuchen. Der Plaque-Assay soll den Einfluss der IFITM-Proteine auf eine multizyklische Replikation untersuchen.

Bei der einzyklischen Replikation wird eine 10fach-Verdünnungsreihe der Viren erstellt. Die Zellen werden infiziert und anschließend die Titer wie zuvor beschrieben bestimmt. Anschließend wird die Differenz zwischen den Titern in IFITM2- und IFITM3-exprimierenden Zellen und dem Titer in MDCK-G Zellen bestimmt.

Der Plaqueassay wird entsprechend des Protokolls in 3.4.2 durchgeführt. Nach Färbung der Plaques (s. 3.4.3) werden die Plaques anschließend eingescannt und die Plaquegröße mit Hilfe des *Ruler-Tools* des Programms Photoshop CS3 vermessen. Dabei dient die Plaquegröße als ein Indikator für eine effiziente Replikation. Große Plaques deuten auf eine effizientere Replikation hin als kleine Plaques. Die Plaquegröße in IFITM2- und IFITM3 exprimierenden Zellen wird dabei in Relation zu der Plaquegröße in MDCK-G Zellen gesetzt.

3.6 Mucuscharakterisierung

3.6.1 Entnahme von Mucusproben

Der in dieser Arbeit verwendete bronchiale Mucus wurde von HTBE-Kulturen gesammelt. Dafür wird zu ausdifferenzierten HTBE-Kulturen 200 µl PBSdef pro Kultur gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Überstand aller Kulturen desselben Donors in einem Gefäß vereint und bei 3000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der HNE-Mucus entstammt humanen nasales Epithel (HNE)-

Kulturen und wird wie der HTBE-Mucus gesammelt (s. o.). Der nasale Mucus wurde von einem Freiwilligen zur Verfügung gestellt und wurde wie durch Wilson et al. Beschrieben entnommen (Wilson and Allansmith, 1976).

3.6.2 Nachweis von IAV-Rezeptoren mittels spezifischer Lektine

Der Rezeptor von IAV sind terminale Sialinsäuren. Sialinsäuren können mit spezifischen Lektinen nachgewiesen werden. Lektine sind Zucker-bindende Proteine. Die für den Nachweis von IAV-Rezeptoren relevanten Lektine sind SNA aus *Sambucus nigra* und MAL-I und MAL-II aus *Maackia amurensis*. SNA bindet spezifisch an Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, den humanen Rezeptortyp. MAL-I bindet an Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, den Rezeptortyp für Geflügelviren. MAL-II bindet an Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc, den Rezeptortyp für IAV aus wildlebenden Wasservögeln. Aviäre Viren können sich in der Erkennung von Seitengruppen am Rezeptor, wie z.B. Fucosegruppen oder Sulfatgruppen, unterscheiden (s. 1.4.1). Mögliche Seitengruppen der Sialinsäuren können durch die in dieser Arbeit verwendeten Lektine nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit dient die Lektinfärbung dem Sialinsäurenachweis in verschiedenen Mucusproben. Es wird ein *Solid-phase-Assay* verwendet. Dabei binden biotinylierte Lektine an die Sialinsäuren der Proben, mit denen ELISA-Platten beschichtet wurden. Die Lektine kann man durch Zugabe eines HRP-gekoppelten Streptavidin nachweisen. Durch Zugabe eines HRP-Substrats kann man gebundene Lektine spektroskopisch nachweisen. Dabei nimmt die Absorption mit steigendem Verdünnungsfaktor der Probe ab (s. Abb. 3.8).

Durchführung

Eine ELISA-Platte wird mit 50 μ l/Vertiefung einer Verdünnungsreihe der Probe (Proben verdünnt in PBSdef, Startverdünnung 1:100) beschichtet. Als Kontrolle dienten Verdünnungsreihen von Fetuin (Startkonzentration: 5 μ g/ml), 3'SLN (Startkonzentration: 1 μ M), 6'SLN (Startkonzentration: 1 μ M) und Siatf (Startkonzentration: 1 μ M). Dabei diene das Polymer 6'SLN als Analog für Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, das Polymer 3'SLN für Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc und Siatf als Analog für Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc. Die Platte wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die ELISA-Platte mit 100 μ l/Vertiefung der Blocklösung (0,1% NA-behandeltes BSA in PBSdef) für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Blocklösung wird entfernt und die Vertiefungen werden zweimal mit PBSdef gewaschen. Die biotinylierten Lektine werden in Lektinlösung verdünnt. Dabei wird das Lektin SNA 1:10.000, das Lektin MAL-I 1:1.600 und das Lektin MAL-II 1:400 verdünnt. Die Lektinverdünnungen werden auf die Platte gegeben (50 μ l/Vertiefung) und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach werden die Verdünnungen abgenommen

und die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBSdef + 0,1% Tween80) gewaschen. Anschließend wird HRP-gekoppeltes Streptavidin in Lektinlösung 1:400 verdünnt. Pro Vertiefung werden 50 µl des Streptavidins hinzugegeben. Die Platte wird anschließend für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wird das Streptavidin entfernt und die Platte wird fünfmal gewaschen. Gebundenes Streptavidin wird durch die Zugabe des HRP-Substrats TMB (100 µl/ Vertiefung) detektiert. Die Farbreaktion wird mit Schwefelsäure (5%) abgestoppt (50 µl/Vertiefung). Die Absorption wird anschließend bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die gemessene Absorption wird gegen die Mucusverdünnung aufgetragen (s. Abb. 3.8).

Um die Sialinsäurekonzentration für SNA, MAL-I und MAL-II zu bestimmen, wird mittels linearer Interpolation die Verdünnung des Mucus und der Polymere bestimmt, bei der die Absorption halbmaximal war ($X_{0,8}$). Im Falle von SNA und MAL-II betrug die halbmaximale Absorption 0,8, im Falle von MAL-I war sie 0,5. Mit der errechneten Konzentration $c_{0,8}$ des Polymers (s. Abb. 3.8) kann man anschließend die Konzentration der Sialinsäuren der Mucusproben bei dieser Absorption berechnen. Die Gesamtkonzentration c_{tot} der Sialinsäuren in den Mucusproben ergibt sich dann aus der Formel:

$$c_{\text{tot}} = c_{0,8} \times X_{0,8}$$

Mit $X_{0,8}$ als Verdünnungsfaktor des Mucus bei einer Absorption von 0,8 und $c_{0,8}$ als Konzentration des entsprechenden Polymers bei einer Absorption von 0,8. Für MAL-I wurde die Berechnung entsprechend an die Absorption von 0,5 angepasst.

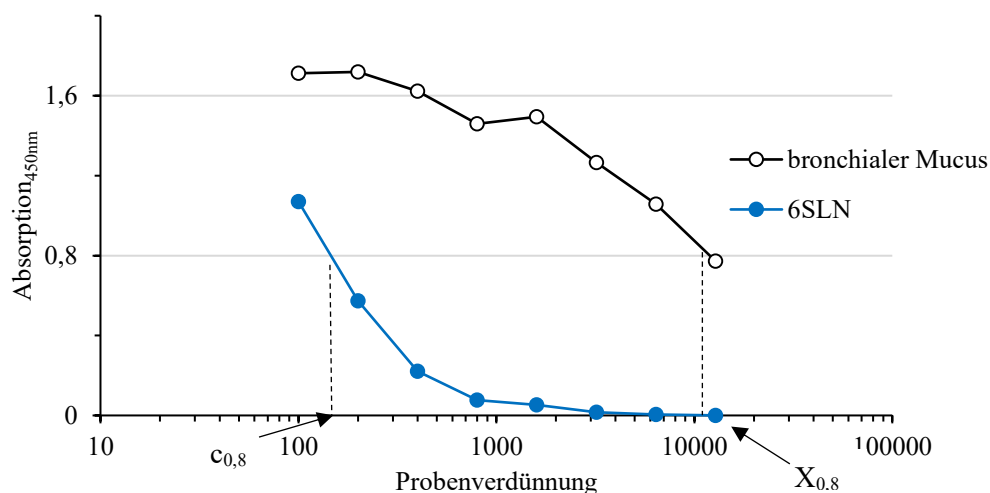


Abbildung 3.8: Bestimmung von $c_{0,8}$ und $X_{0,8}$ zur Berechnung der Sialinsäurekonzentration.

3.6.3 Fraktionierung des Mucus

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Inhibitoren für aviäre und humane IAV in verschiedenen Fraktionen vorkommen und somit unterschiedliche Eigenschaften haben.

Zusätzlich sollte untersucht werden, welchen Einfluss Exosomen auf die Bindung von IAV haben. Exosomen sind vesikuläre Strukturen, die in humanen Bronchialmucus vorkommen können. Für Exosomen wurde weiterhin gezeigt, dass sie die Infektion von IAV inhibieren können (Kesimer et al., 2009).

Durch eine differentielle Zentrifugation, inklusive Ultrazentrifugation (UZ), sollte der Mucus fraktioniert werden, um einzelne Komponenten wie z.B. Exosomen oder lösliche Muzine zu separieren. Exosomen kommen dabei in den Pellets der Ultrazentrifugation vor. Dahingegen werden lösliche Muzine in den UZ-Überstand sezerniert.

Durchführung

1,5 ml Mucus werden zunächst bei 10.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet aus diesem Zentrifugationsschritt wird in 100 µl PBSdef resuspendiert. Es wird im Folgenden als „LZ-Pellet“ bezeichnet. Der Überstand wird anschließend für 2 h bei 110.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet aus diesem Schritt wird ebenfalls in 100 µl PBSdef resuspendiert. Es wird als „UZ-Pellet“ bezeichnet. Der Überstand wird als „UZ-Überstand“ bezeichnet.

Anschließend wird im Fetuin-Bindungs-Inhibitionsassay (s. 3.5.7.3) die inhibitorische Wirkung der Proben auf die Fetuinbindung verschiedener Viren untersucht. Als Kontrolle dient die Inhibition durch den ursprünglichen Mucus. Die inhibitorische Wirkung wird quantifiziert, indem mittels linearer Interpolation die Verdünnung aller Proben bestimmt wird, bei der 50 % der Absorption noch vorhanden sind (s. Abb. 3.9). Es wurde definiert, dass bei 50 % Absorption eine inhibitorische Einheit (IU) vorhanden war. Die Gesamtmenge an inhibitorischen Einheiten (IU_{tot}) einer Probe ergibt sich aus der Gleichung:

$$IU_{\text{tot}} = 20 \times X_{50\%} \frac{IU}{ml} \times V_{\text{tot}}$$

Mit $X_{50\%}$ als Verdünnungsfaktor, bei der 50 % der Absorption (1 IU) vorhanden ist und V_{tot} als Gesamtvolumen der Probe. Der Faktor 20 ergibt sich aus der eingesetzten Menge des Inhibitors von 50 µl. Die inhibitorische Wirkung wird anschließend in Relation zur inhibitorischen Wirkung des unbehandelten Mucus gesetzt.

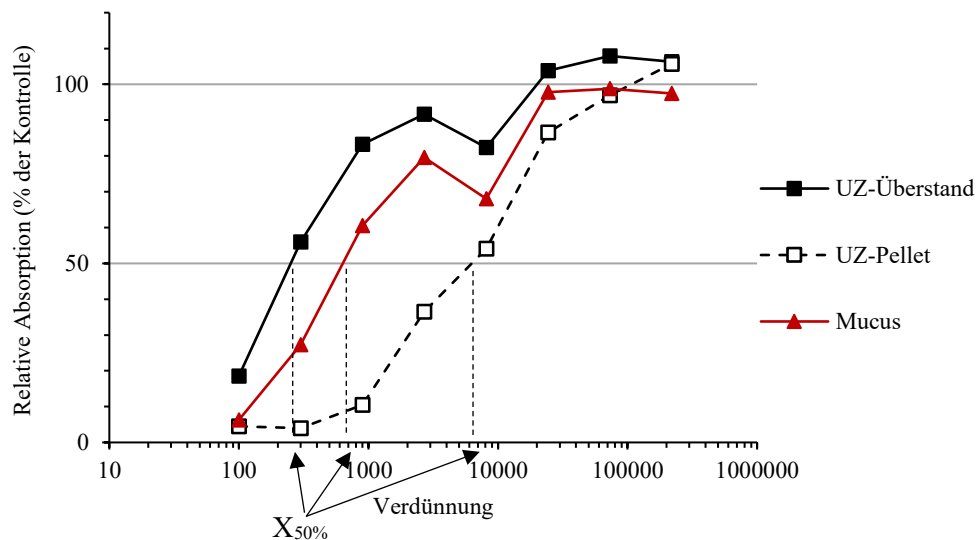


Abbildung 3.9: Bestimmung von $X_{50\%}$ der Mucusfraktionen im Fetuin-Bindungs-Inhibitions-Assay.

3.6.4 Detektion von Inhibitoren im Mucus

Mucus kann hitze-instabile β -Inhibitoren, sialinsäurehaltige Proteine oder auch Antikörper enthalten, die alle einen Einfluss auf die Bindung von IAV haben können. Um zu überprüfen ob solche Inhibitoren die Bindung von IAV beeinflussen können, wird ein Teil der Mucusprobe für 1 h bei 37°C mit einer Sialidase von *V. cholerae* vorbehandelt um Sialinsäuren abzuspalten. Ein weiterer Teil der Mucusprobe wird für eine Stunde bei 62°C inkubiert um β -Inhibitoren zu inhibieren. Als Kontrolle dient eine NA-behandelte BSA-Probe. Als weitere Kontrolle für eine effiziente Inhibition dient unbehandelter Mucus. Alle Proben werden im indirekten Fetuin-Bindungs-Inhibitionsassay (s. 3.5.7.3) auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1 untersucht.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des *Student's T-Test*. Wenn nicht anders beschreibend wurde der Mittelwert aller Ergebnisse sowie die Standardabweichung ermittelt um den p-Wert zu berechnen. Dabei wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant bewertet. Die statistische Signifikanz wurde nach folgender Klassifizierung gekennzeichnet:

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Viren

4.1.1 Herstellung rekombinanter Viren

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Hämagglutinins (HA) und der Neuraminidase (NA) auf die Virussensitivität gegenüber humanen Wirtsfaktoren untersucht werden. Dafür wurden 2:6 rekombinante Viren hergestellt. Diese sollten das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) repräsentativer humaner, aviärer und zoonotischer Viren und die internen Gene des Laborstranges A/Puerto Rico/8/1934 enthalten. Zur Herstellung dieser Viren wurde das Acht-Plasmid-System nach Hoffmann et al. verwendet (s. 3.3). Dafür wurden das HA- und NA-Gen der Viren A/Mallard/New York/6750/1978, A/Mallard/Alberta/34/2001 und A/Shanghai/2/2013 in das pHW2000-Plasmid kloniert.

Die neu hergestellten rekombinanten Viren enthalten die Glykoproteine HA und NA von A/Mallard/New York/6750/1978 (mal-H2N2), A/Mallard/Alberta/34/2001 (mal-H7N1) und A/Shanghai/2/2013 (Sh-H7N9) sowie alle anderen Gene des Virus A/Puerto Rico/8/1934. Die Viren Mem-H1N1, mal-H1N1 und VN-H5N1 wurden von Janina Wolf zur Verfügung gestellt, neu passagiert und titriert. Dabei enthalten die Viren mal-H1N1, mal-H2N2 und mal-H7N1 das HA und die NA aviärer Viren (s. Tabelle 4.1). Das Virus Mem-H1N1 enthält die Glykoproteine eines repräsentativen humanen saisonalen Virus und die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 die Glykoproteine zoonotischer Viren (s. Tabelle 4.1).

Um den Einfluss der Rezeptorbindungs- und Fusionseigenschaften näher analysieren zu können wurden die Mutationen Y98_IF, H17_IY, H17_IR und K82₂T mittels gezielter Mutagenese (s. 3.1.3) in das HA des Virus A/Hong Kong/1/1968 eingefügt. Dabei entschieden wir uns für dieses Virus, da die Glykoproteine bereits im pHW2000-Plasmid vorlagen und die Mutationen bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wurden. Diese Mutationen sollten zum einen den Fusions-pH ändern, wie im Falle der Mutationen H17_IY, H17_IR und K82₂T. Zum anderen sollte die Rezeptorspezifität verändert werden, wie im Falle der Mutationen Y98_IF, L226_IQ und S228_IG.

Für die Mutation H17_IY wurde gezeigt, dass sie den Fusions-pH um 0,3 Einheiten absenkt (Thoennes et al., 2008). Die Mutation H17_IR hingegen soll den Fusions-pH um 0,7 Einheiten erhöhen (Rott et al., 1984). Auch die Mutation K82₂T soll den Fusions-pH um 0,4 Einheiten erhöhen (Lin et al., 1997).

Die Mutation Y98_IF hingegen verändert die Rezeptorbindung. Für sie wurde gezeigt, dass beim Auftreten dieser Mutation die Bindungsstärke und die Replikationseigenschaften stark beeinflusst sind (Martin et al., 1998; Bradley et al., 2011). Die rekombinanten HK-Mutanten wurden von Luca Hensen hergestellt.

Zusätzlich wurde ein rekombinantes Virus mit den Mutationen L226_IQ und S228_IG im HA von A/Hong Kong/1/1968 produziert. Diese Mutationen führen zur Änderung der Rezeptorspezifität von α 2-6- zu α 2-3-verknüpften Sialinsäuren (Matrosovich et al., 2007).

Auch die Fusions- und Bindungsmutanten besitzen als Hintergrund die internen Gene des Laborstammes A/Puerto Rico/8/1934. Als Kontrolle aller Mutanten diene ein rekombinantes Virus mit dem wildtypischen HA und der NA von A/Hong Kong/1/1968.

Die Identität aller rekombinanten Viren wurde mittels Sequenzierung des HAs und der NA (s. 3.1.5) bestätigt. Es konnten keine Mutationen im Vergleich zu den Datenbank-Sequenzen der Wildtypviren innerhalb des HAs und der NA detektiert werden.

4.1.2 Rezeptorspezifität der rekombinanten Viren

Tabelle 4.1: Rezeptorbindungseigenschaften der rekombinanten Viren. n.b.: nicht bestimmt; Nummern in Klammern geben die Referenz an: (1) Matrosovich et al., 2004b; (2) Matrosovich et al., 2007; (3) Matrosovich et al., 2000; (4) Gambaryan et al., 2012; (5) Gambaryan et al., 2006; (6) Shi et al., 2013.

Virusname	Herkunft von HA und NA	Rezeptorspezifität	Präferiertes Polymer
Mem-H1N1	A/Memphis/14/96	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (1,2)	6'SLN
mal-H1N1	A/Mallard/Alberta/119/1998	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc (1,2)	3'SLN
mal-H2N2	A/Mallard/New York/6750/1978	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc (3)	3'SLN
mal-H7N1	A/Mallard/Alberta/34/2001	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc (4)	3'SLN
VN-H5N1	A/Vietnam/1203/2004	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc (5) Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(6-Su)GlcNAc (5)	3'SLN
Sh-H7N9	A/Shanghai/2/2013	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(6-Su)(Fuc α 1-3)GlcNAc (6) Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(6-Su)GlcNAc (6) Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (6)	n.b.

Die Rezeptorspezifität der rekombinanten Viren wurde gemessen, um zu überprüfen, ob die Rezeptorbindungseigenschaften der wildtypischen Viren erhalten geblieben sind. Die Rezeptorbindungseigenschaften der wildtypischen Viren wurden bereits beschrieben (s. 1.4.1) und sind in Tabelle 4.1 angegeben. Die Rezeptorspezifität der rekombinanten Viren wurde mittels direktem Fetuin-Bindungs-Assay bestimmt (s. 3.5.7.2, Daten nicht gezeigt). Dabei wird die Bindung von biotinylierten Polymeren mit spezifischen Glykosilierungsmustern an IAV bestimmt. Im Falle dieser Arbeit waren dies das 3'SLN- und das 6'SLN-Polymer. Diese dienen als Substratanaloga für den aviären (3'SLN) beziehungsweise den humanen (6'SLN)

Rezeptortyp. Gebundene Polymere werden anschließend durch Zugabe eines HRP-gekoppelten Streptavidins und anschließender Zugabe des HRP-Substrats TMB detektiert.

Die Rezeptorspezifität des Sh-H7N9 wurde nicht getestet, da es zum Zeitpunkt der Experimente nicht vorlag. Das Virus Mem-H1N1 präferierte die Bindung an das 6'SLN-Polymer (s. Tabelle 4.1), wohingegen die Viren mal-H1N1, mal-H2N2, mal-H7N1 und VN-H5N1 die Bindung an das 3'SLN-Polymer präferieren (s. Tab. 4.1). Die ermittelten Bindungseigenschaften der rekombinanten Viren entsprechen denen der korrespondierenden wildtypischen Viren.

4.1.3 Bestimmung der fusogenen Eigenschaften der rekombinanten Viren

Neben den Rezeptorbindungseigenschaften der rekombinanten Viren sollten die Fusionseigenschaften der Viren bestimmt werden, um zu untersuchen, ob sich die rekombinanten Viren vergleichbar zu ihren korrespondierenden Wildtypisolaten verhalten. Die Fusionseigenschaften können speziesabhängig variieren. Humane IAV und IAV aus wildlebenden Wasservögeln fusionieren meist bei einem niedrigeren pH als zoonotische IAV (Baumann et al., 2015; Scholtissek, 1985). Zur Bestimmung der fusogenen Eigenschaften wurden drei Experimente durchgeführt.

4.1.3.1 pH-induzierte Konformationsänderung des Hämagglutinins

In diesem Versuch sollte die pH-abhängige HA-Konformationsänderung der einzelnen rekombinanten Viren verglichen werden (s. 3.5.3). Die Viren wurden auf mit Fetuin beschichteten ELISA-Platten immobilisiert. Anschließend wurden die Viren mit verschiedenen pH-Puffern inkubiert. Durch die pH-Behandlung durchläuft das HA eine Konformationsänderung, die zum Verlust der Rezeptorbindung führt. Die HAs, die keine Konformationsänderung durchlaufen haben, werden durch HRP-gekoppelte Fetuine detektiert. Als Vergleich zwischen den verschiedenen Viren wurde mittels linearer Interpolation der pH-Wert ($\text{pH}_{50\text{-HA}}$) bestimmt, bei dem 50 % der Absorption im Vergleich zur Kontrolle bei pH 7 noch vorhanden sind (s. Abb. 3.6). Das HA des Virus Mem-H1N1 verändert die Konformation beim niedrigsten pH (s. Tab. 4.2). Die Viren mal-H1N1 und mal-H2N2 weisen im Vergleich zu Mem-H1N1 einen leicht höheren $\text{pH}_{50\text{-HA}}$ auf. Dahingegen ändern die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 im Vergleich zu den anderen Viren beim höchsten pH die Konformation.

4.1.3.2 Inhibition der Infektion durch Ammoniumchlorid

Zur Bestimmung der intrazellulären fusogenen Eigenschaften des HAs der rekombinanten Viren wurde der pH-abhängige endosomale Viruseintritt durch die Ammoniumchlorid (NH_4Cl)-abhängige Inhibition bestimmt (s. 3.5.2). Bei der Reifung des Endosoms hin zum Lysosom wird der pH des Endosomeninneren gesenkt. NH_4Cl verhindert dosisabhängig die Absenkung des endosomalen pH, was zur Inhibition der Infektion führt. Zum Vergleich der Viren wurde die inhibitorische Konzentration, bei der die Infektion um 50 % reduziert wurde, bestimmt (IC_{50}) (s. Abb. 3.5). Viren, die bei einem niedrigen endosomalen pH fusionieren, sind sensitiver gegenüber NH_4Cl (niedrige IC_{50}) als Viren, die bei einem hohen endosomalen pH fusionieren (hohe IC_{50}).

Die zoonotischen Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 weisen eine geringe Sensitivität gegenüber NH_4Cl auf (s. Tab. 4.2). Dahingegen zeigen das humane Virus Mem-H1N1 und die aviären Viren mal-H1N1, mal-H2N2 und mal-H7N1 eine höhere Sensitivität gegenüber NH_4Cl (s. Tab. 4.2).

Zusammen mit den Ergebnissen der Bestimmung des pH_{50} der Konformationsänderung (s. 4.1.3.1) zeigen diese Ergebnisse, dass die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 bei einem hohen endosomalen pH die Fusion induzieren, während die Viren Mem-H1N1, mal-H1N1, mal-H2N2 und mal-H7N1 bei einem niedrigeren endosomalen pH die Fusion induzieren.

4.1.3.3 Virusinaktivierung durch niedrigen pH

Die pH-abhängige Virusinaktivierung ist ein Indikator für die Stabilität der Viren in der Umwelt. Humane Viren und Viren aus wildlebenden Wasservögeln weisen meist eine höhere Stabilität auf als Viren aus domestiziertem Geflügel. Die Stabilität korreliert dabei mit dem Fusions-pH (s. 1.4.3). Dieser Versuch beruht auf dem Verlust der Infektionsfähigkeit der Viren durch Vorbehandlung der Viren mit unterschiedlichen pH-Puffern (s. 3.5.1).

Die zoonotischen Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 weisen eine geringe Stabilität mit einem pH_{50} zwischen 5,5 und 5,7 auf (s. Tab. 4.2). Demgegenüber zeigen das humane Virus Mem-H1N1 sowie die aviären Viren mal-H1N1 und mal-H2N2 eine hohe Stabilität mit einem pH_{50} von 5,2 bis 5,3 (s. Tab. 4.2). Somit zeigen die rekombinanten Viren die speziestypischen Fusions- und Stabilitätseigenschaften.

Tabelle 4.2: Viruseigenschaften: pH der Konformationsänderung, Inhibition durch NH₄Cl, pH-Stabilität; MW: Mittelwert; KI: 95 %-Konfidenzintervall; P: p-Wert, der mittels zweiseitigem *Student's T-Test* gegenüber dem Virus Mem-H1N1 bestimmt wurde, auf drei Nachkommastellen gerundet; n.b.: Wert wurde in diesem Experiment nicht bestimmt (s. 3.7); (n): Anzahl der Replikate.

Virus	pH der Konformationsänderung (pH _{50-HA})			IC ₅₀ (NH ₄ Cl in mM)			pH-Stabilität (pH ₅₀)		
	MW	KI (n)	P	MW	KI (n)	P	MW	KI (n)	P
Mem-H1N1	4,7	±0,08 (12)		0,48	±0,08 (12)		5,23	±0,04 (8)	
mal-H1N1	4,9	±0,07 (12)	0,000	0,77	±0,07 (8)	0,000	5,28	±0,06 (7)	0,333
mal-H2N2	5,1	±0,10 (12)	0,000	1,17	±0,10 (4)	0,000	5,24	±0,10 (4)	0,800
mal-H7N1	n.b.			0,89	±0,12 (8)	0,000	5,48	±0,10 (5)	0,000
VN-H5N1	5,7	±0,05 (14)	0,000	1,55	±0,05 (8)	0,000	5,66	±0,02 (12)	0,000
Sh-H7N9	5,6	±0,09 (6)	0,000	1,36	±0,09 (2)	0,000	5,64	±0,01 (4)	0,000

4.2 Replikationsverhalten rekombinanter Influenza-A-Viren

Es besteht die Hypothese, dass humane Viren ausschließlich in den oberen Atemwegen replizieren, dem tracheo-bronchialen Epithel, wohingegen aviäre und zoonotische Viren hauptsächlich in den tieferen Atemwegen, dem Epithel der Alveoli replizieren. Diese Hypothese sollte mit den rekombinanten Viren untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Modellsysteme der humanen Atemwege infiziert und das Wachstumsverhalten über einen Zeitraum von mindestens 72 h beobachtet (s. Abb. 4.1).

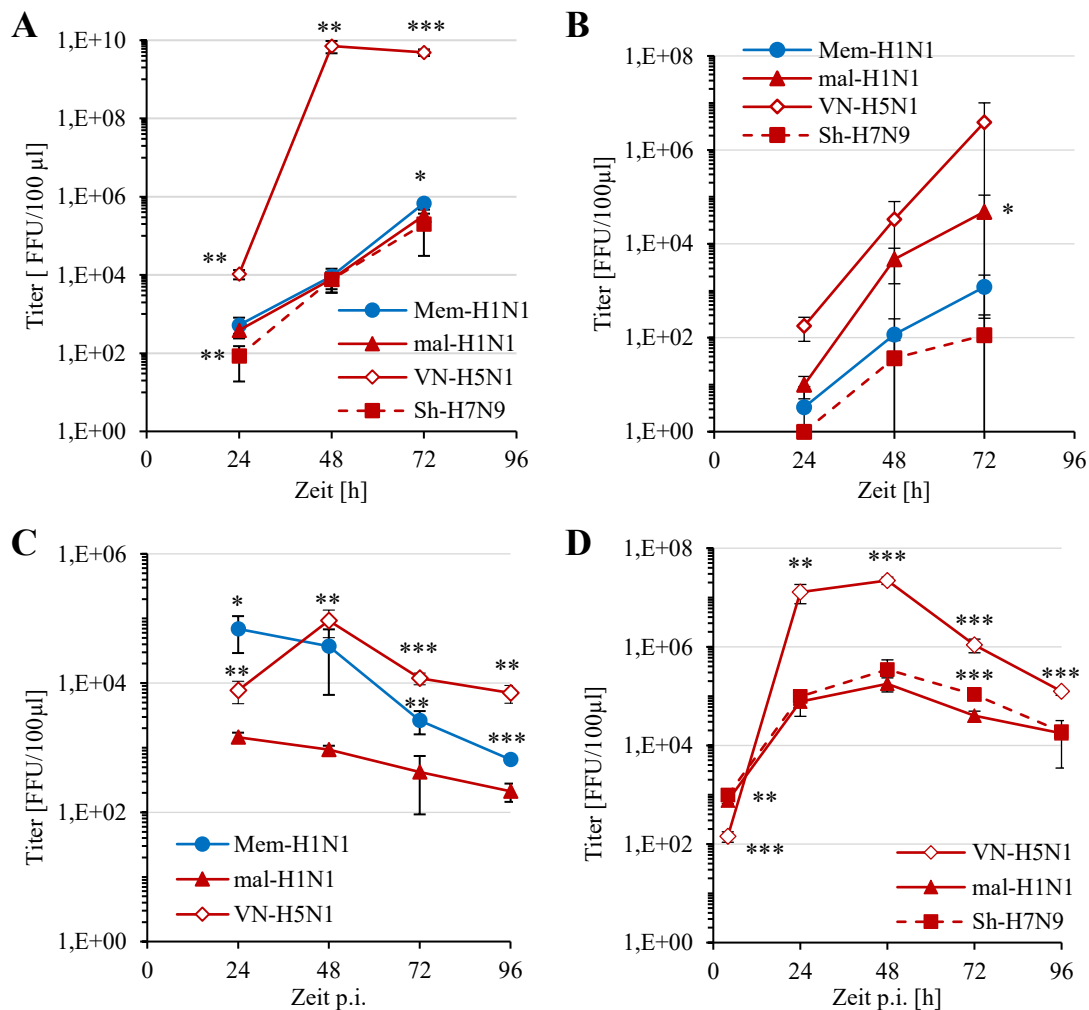


Abbildung 4.1: Wachstumskinetiken in A) Calu3-Zellen (n=3), B) HTBE-Kulturen (n=3), C) und D) HAEC-Kulturen (n=2). Blau: humanes Virus (Mem-H1N1), rot: aviäre und zoonotische Viren. Repräsentative Ergebnisse von 3 (A, B) bzw. 2 (C, D) Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* gegen das Virus mal-H1N1 getestet (s. 3.7).

4.2.1 Replikationsverhalten in Calu3-Zellen

Das Wachstumsverhalten in Calu3-Zellen wurde beobachtet, da diese Zellen eine permanente Zelllinie aus dem humanen Lungenepithel sind und somit dem Replikationsort der IAV entstammen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Alle 24 h wurden Proben des Überstands entnommen, deren Titer nach einzyklischer Replikation (s. 3.4.1) bestimmt wurden. In Calu3-Zellen replizierte das Virus VN-H5N1 sehr effizient zu hohen Titern von bis zu $7,1 \cdot 10^9$ FFU/100 μ l (s. Abb. 4.1 A). Die Viren Mem-H1N1, mal-H1N1 und Sh-H7N9 replizierten im Vergleich zu VN-H5N1 deutlich ineffizienter. Die Titer unterschieden sich dabei im Vergleich zu den Titern des Virus VN-H5N1 um vier log-Stufen.

4.2.2 Replikationsverhalten in primären humanen tracheo-bronchialen Epithelzellen (HTBE)

Der primäre Replikationsort von IAV im Menschen ist das tracheo-bronchiale Epithel. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuch das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren in HTBE-Kulturen untersucht (s. 3.5.4.1). HTBE-Kulturen sind ein Modellsystem für die tracheo-bronchialen Atemwege. Die HTBE-Kulturen wurden mit 400 PFU/ Filter der rekombinanten Viren infiziert. Alle 24 h wurden Proben entnommen und die Titer mittels einzyklischer Replikation bestimmt (s. 3.4.1).

Alle getesteten Viren konnten in diesem Zellsystem replizieren (s. Abb. 4.1 B). Die beiden Viren VN-H5N1 und mal-H1N1 replizierten effizienter als die beiden Viren Mem-H1N1 und Sh-H7N9. Das Virus mal-H1N1 zeigte 72 h nach der Infektion einen um fast zwei log-Stufen niedrigeren Titer als das Virus VN-H5N1. Das Virus Mem-H1N1 replizierte weniger effizient als die Viren VN-H5N1 und mal-H1N1. Das Virus Sh-H7N9, welches 72 h nach der Infektion einen Titer von $1,1 \cdot 10^2$ FFU/100 μ l aufwies (s. Abb. 4.1 B), wuchs am ineffizientesten.

4.2.3 Replikationsverhalten in primären humanen Typ II-Pneumozyten (HAEC)

Im vorherigen Versuch wurde das Replikationsverhalten der Viren in den oberen Atemwegen untersucht. In Typ II-Pneumozyten sollte das Replikationsverhalten in den unteren Atemwegen, den Alveoli, validiert werden. Das Epithel der Alveoli wird hauptsächlich von Typ I-Pneumozyten gebildet. Weiterhin befinden sich im Alveolarepithel Typ II-Pneumozyten, welche unter anderem als Stammzellen für Typ I-Pneumozyten dienen. Typ II-Pneumozyten wurden mit den rekombinanten Viren infiziert und über einen Zeitraum von 96 h wurden Proben entnommen. Die Titer der Proben wurden nach einzyklischer Replikation bestimmt (s. 3.4.1).

Es zeigte sich, dass das Virus VN-H5N1 und das Virus Mem-H1N1 Virus in diesen primären Zellen zu signifikant höheren Titern replizierten als das mal-H1N1 oder das Sh-H7N9 Virus (s. Abb. 4.1 C und D). In beiden Fällen waren 24 h nach der Infektion die Titer bis zu zwei log-Stufen höher als die der Viren mal-H1N1 und Sh-H7N9. Das Maximum der Replikation war spätestens nach 48 h erreicht. Das Virus mal-H1N1 wies zu diesem Zeitpunkt einen um 2-log-Stufen niedrigeren Titer auf. Das Virus Sh-H7N9 replizierte vergleichbar zum Virus mal-H1N1 (s. Abb. 4.1 D). Die Titer von VN-H5N1 und Mem-H1N1 näherten sich erst 72 h nach der Infektion den Titern von mal-H1N1 und Sh-H7N9 an (s. Abb. 4.1 D).

Die Replikationsversuche zeigen, dass das Virus VN-H5N1 sehr effizient in allen Zellsystemen repliziert. Dies deutet darauf hin, dass die Glykoproteine des Virus VN-H5N1 eine Ursache für die hohe Pathogenität des H5N1-Subtyps im Menschen sein können, da sie die Replikation dieses Virus in verschiedenen Gewebetypen ermöglichen. Weiterhin zeigen die Replikationsversuche, dass das humane Virus, Mem-H1N1, in HAEC-Kulturen effizienter repliziert als in Calu3-Zellen und HTBE-Kulturen. Im Vergleich zu VN-H5N1 replizieren die Viren mal-H1N1 und Sh-H7N9 in allen Zellsystemen weniger effizient. Die effiziente Replikation der Viren Mem-H1N1 und VN-H5N1 in HAEC-Kulturen deutet darauf hin, dass der starke Tropismus aviärer Viren in Alveoli nicht abhängig von der Rezeptorspezifität sein muss. Eine ineffiziente Replikation rekombinanter Viren, wie es bei den Viren Sh-H7N9 und mal-H1N1 der Fall ist, kann auch auf eine Inkompatibilität der Glykoproteine mit den internen Genen des Virus A/Puerto Rico/8/1934 zurückzuführen sein. Ein ähnlicher Effekt konnte ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden (Johnson et al., 2015).

4.3 Inhibition der IAV-Infektion durch humanen Atemwegsmucus

Mucus wird als physikalische Barriere auf die Oberfläche des Respirationsepithels, dem primären Replikationsorts von IAV, sezerniert. In ihm sind IAV-bindende Proteine enthalten, die die Infektion inhibieren (Tamura und Kurata, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Infektion aviärer Viren stark durch bronchialen Mucus gehemmt wird, während die Infektion humaner Viren nur gering durch Mucus gehemmt wird. Die Daten, die zur Inhibition aviärer und humaner Viren durch Mucus früher erhoben worden waren, lassen jedoch keine eindeutigen Schlüsse zur Inhibition von IAV durch Mucus zu (s. 1.7.1).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Interaktion von IAV mit Proben von bronchialen Mucus und nasalen Mucus untersucht.

4.3.1 Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in MDCK-Zellen

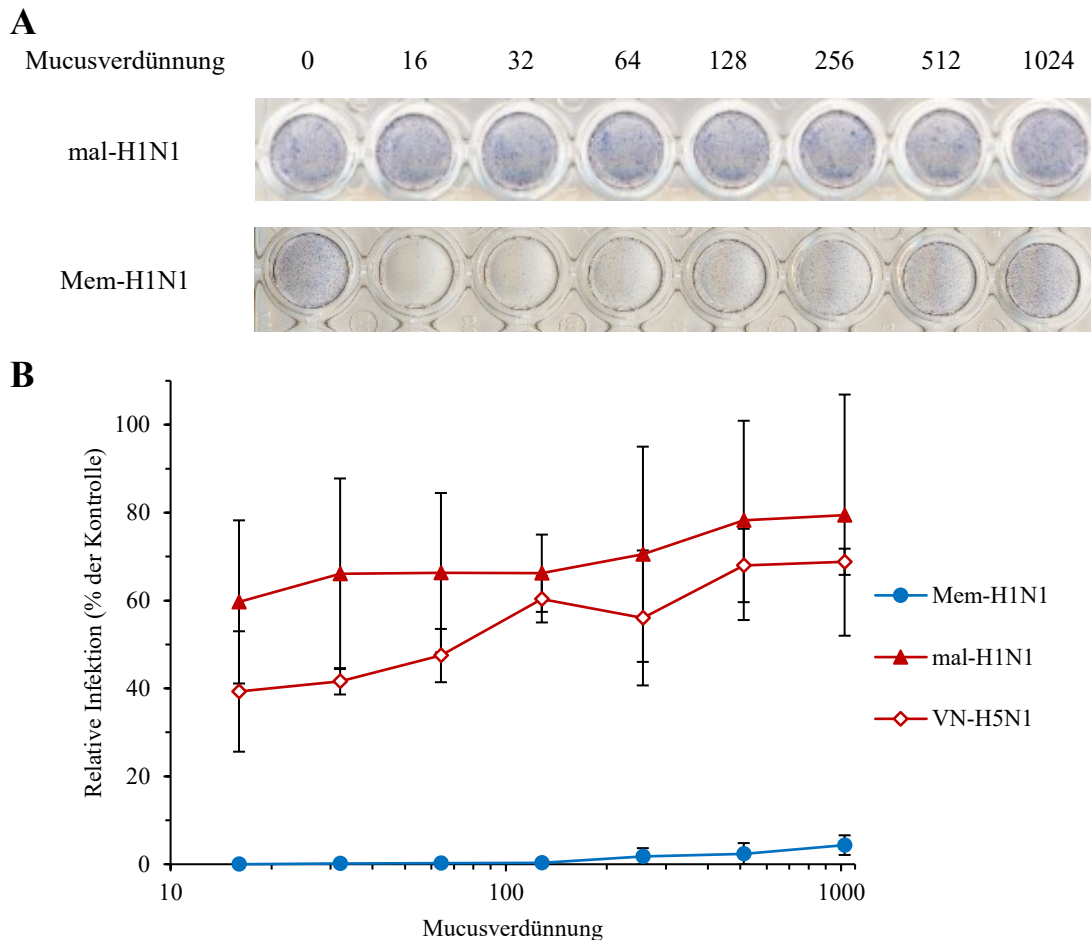


Abbildung 4.2: Inhibition rekombinanter Viren durch humanen bronchialen Mucus (Präparation HTBE-1, s. 3.6.1) in MDCK-Zellen. Es wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe des Mucus angelegt und die Viren mit diesen Verdünnungen für 15 min inkubiert. Anschließend wurden MDCK-Zellen mit dieser Mischung infiziert. Anschließend wurden infizierte Zellen durch eine immunhistochemische Färbung detektiert (s. 3.5.5). **A)** Beispiel für immunhistochemische Färbung bei der Virusinhibition durch Mucus, **B)** Inhibition der Infektion durch Mucus (n=3). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* gegenüber dem Virus Mem-H1N1 berechnet (s. 3.7). Die Viren mal-H1N1 und VN-H5N1 unterscheiden sich bei allen Mucusverdünnungen signifikant ($p < 0,05$) vom Virus Mem-H1N1.

Ziel dieses Versuches war es, den inhibitorischen Effekt des bronchialen Mucus auf die IAV-Infektion zu untersuchen (s. 3.5.6). Bronchialer Mucus wurde aus HTBE-Kulturen gewonnen, welche Mucus auf ihre Oberfläche sezernieren (s. 3.6.1). MDCK-Zellen wurden mit den rekombinanten Viren in Anwesenheit verschiedener Mucuskonzentrationen infiziert.

Die Infektion des Virus Mem-H1N1 wurde über den betrachteten Konzentrationsbereich des bronchialen Mucus (Präparation HTBE-1, s. 2.10) annähernd vollständig inhibiert (s. Abb. 4.2 B). Die beiden aviären Viren mal-H1N1 und VN-H5N1 zeigen hingegen eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Mucus. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass humane Viren sensibler gegenüber humanen bronchialen Mucus bei der Infektion von MDCK-Zellen sind als aviäre oder

zoonotische Viren. Es stellt sich die Frage, warum das humane Virus Mem-H1N1 deutlich stärker durch bronchialen Mucus inhibiert wird als das aviäre und das zoonotische Virus.

4.3.2 Bindungsaffinität von Viren in MDCK-Zellen

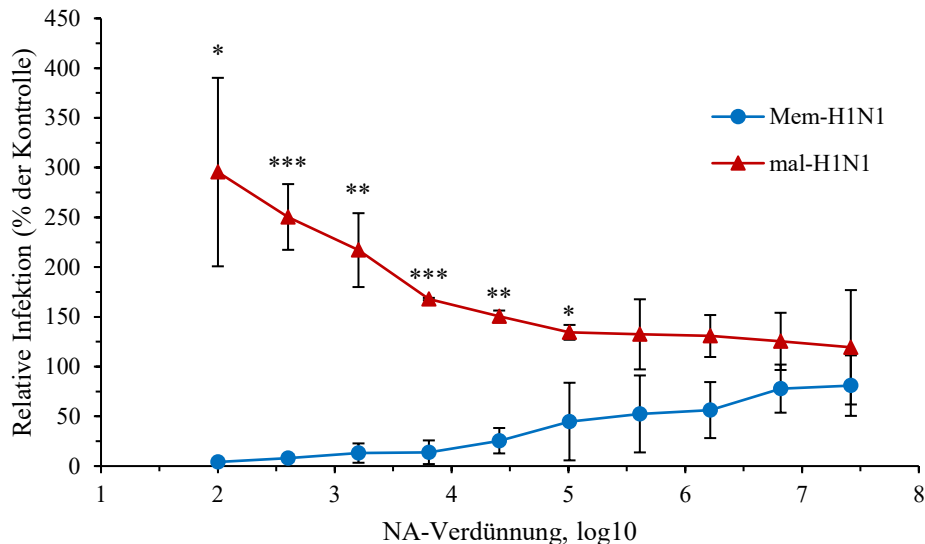


Abbildung 4.3: Infektionseffizienz von Mem-H1N1 und mal-H1N1 nach NA-Behandlung von MDCK-Zellen. Es wurde eine 4-fach Verdünnungsreihe der NA von *V. cholerae* angesetzt (Startverdünnung 1:100). Anschließend wurden MDCK-Zellen mit den einzelnen Verdünnungen für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 200 FFU Virus pro Vertiefung infiziert (s. 3.5.6). Anschließend wurden infizierte Zellen mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP detektiert. Angegeben sind der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* bestimmt (s. 3.7).

Eine Inhibition der Infektion durch Mucus kann von zwei Faktoren abhängig sein. Zum einen kann die Inhibition abhängig von der Rezeptorbindung des Virus sein und zum anderen von der Anzahl der Influenza-Rezeptoren auf den Zellen. Viren, die eine hohe Affinität für ihren Rezeptor auf der Zelloberfläche aufweisen, würden weniger durch Mucus inhibiert als Viren, die eine geringe Affinität für ihren Rezeptor haben. Um zu überprüfen, ob die inhibitorische Wirkung von Mucus abhängig von der Affinität der Viren für ihren Zellrezeptor ist, wurde die Anzahl der Influenza-Rezeptoren auf den Zellen reduziert (s. 3.5.6). Dafür wurden MDCK-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Sialidase von *V. cholerae* inkubiert und anschließend mit den Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1 infiziert. Die Sialidase von *V. cholerae* spaltet die terminalen Sialinsäuren auf den Zellen ab. Die Infektion von Viren mit einer hohen Bindungsaffinität wird durch die Abspaltung der Rezeptoren weniger stark inhibiert als die Infektion von Viren mit einer niedrigen Bindungsaffinität.

Die Vorbehandlung der Zellen mit der NA resultierte im Falle des Mem-H1N1 Virus in einer Reduktion der Infektion (s. Abb. 4.3). Im Gegensatz dazu zeigte das Virus mal-H1N1 einen Anstieg der Infektion auf 300 % bei der niedrigsten NA-Verdünnung (s. Abb. 4.3). Dies deutet

darauf hin, dass das Virus mal-H1N1 eine höhere Affinität zu MDCK-Zellen hat als das Virus Mem-H1N1. Die erhöhte Affinität könnte dazu beitragen, dass die Infektion des Virus mal-H1N1 weniger effizient inhibiert wird, als das zum Beispiel beim Virus Mem-H1N1 der Fall ist.

4.3.3 Verteilung der Sialinsäuren in humanem Mucus

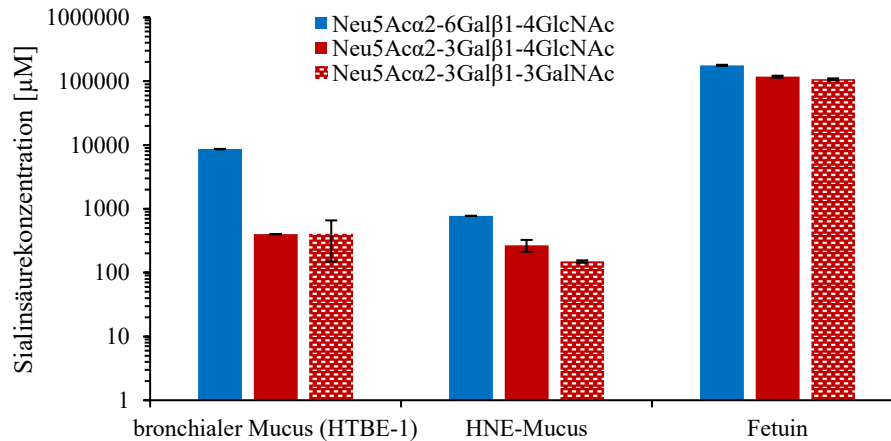


Abbildung 4.4: Verteilung von Sialinsäuren in bronchialem (HTBE-1) und HNE-Mucus. Mucus wurde auf ELISA-Platten gecoatet. Als Kontrolle diente eine Verdünnungsreihe von Polymeren, die entsprechende Zuckerverknüpfungen aufweisen und deren Konzentration bekannt ist. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe biotinylierter Lektine angesetzt. Die Verdünnungen wurden zu den Mucusproben gegeben. Biotinylierte Lektine wurden durch HRP-gekoppeltes Streptavidin nachgewiesen. Das gebundene Streptavidin wurde durch Zugabe des HRP-Substrats TMB detektiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Absorption der Mucusproben in Relation zu der Absorption der Polymere gesetzt (s. 3.6.2). Mittelwert und 95 %-Konfidenzintervall dreier Replikate eines repräsentativen Experimentes.

Aufgrund der unterschiedlich starken Inhibition der Infektion aviärer und humaner Viren durch bronchialen Mucus (s. 4.3.1) stellte sich die Frage nach dem Verhältnis humaner und aviärer Rezeptoren in unterschiedlichen Mucusproben. Ein höherer Anteil humaner Rezeptoren könnte eine verstärkte Inhibition humaner Viren induzieren. Die Quantifizierung der Sialinsäuren erfolgte mit spezifischen Lektinen in einem *Solid-Phase-Assay*. Die Lektine MAL-I und MAL-II binden an α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren wobei das Lektin MAL-I Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-4GlcNAc bindet während das Lektin MAL-II Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-3GalNAc bindet. Diese Lektine dienen dem Nachweis aviärer Rezeptoren. Das Lektin SNA bindet α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren und dient dem Nachweis humaner Rezeptoren. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Standardreihe spezifischer sialinsäurehaltiger Proteine verwendet, die die Verknüpfung der aviären und humanen Viren aufweisen (s. 3.6.2). Als Standard wurde ein natürliches sialinsäurehaltiges Protein, bovines Fetuin, verwendet, das sowohl α 2-3- als auch α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche besitzt.

Im bronchialen Mucus (Präparation HTBE-1, s. 2.11) und im HNE-Mucus konnten α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4). Als Vertreter der aviären Rezeptoren

konnten $\alpha 2\text{-}3\text{-}\beta 1\text{-}4$ -verknüpfte und $\alpha 2\text{-}3\text{-}\beta 1\text{-}3$ -verknüpfte Sialinsäuren im bronchialen und HNE-Mucus nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4). Der bronchiale Mucus weist dabei mehr $\alpha 2\text{-}6$ -verknüpfte Sialinsäuren als $\alpha 2\text{-}3$ -verknüpfte Sialinsäuren auf. Dieser Unterschied ist beim HNE-Mucus weniger stark ausgeprägt. Die Anzahl der aviären Rezeptoren im HNE-Mucus ist vergleichbar mit der Anzahl im bronchialen Mucus. Jedoch könnte dieser Unterschied auch abhängig von der Präparation sein, weswegen weitere Mucusproben untersucht werden müssen. Durch das Vorkommen humaner sowie aviärer Rezeptoren sollte der Mucus in der Lage sein, sowohl humane als auch aviäre IAV zu inhibieren.

4.3.4 Einfluss des NA-Inhibitors Oseltamivircarboxylat auf die Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus

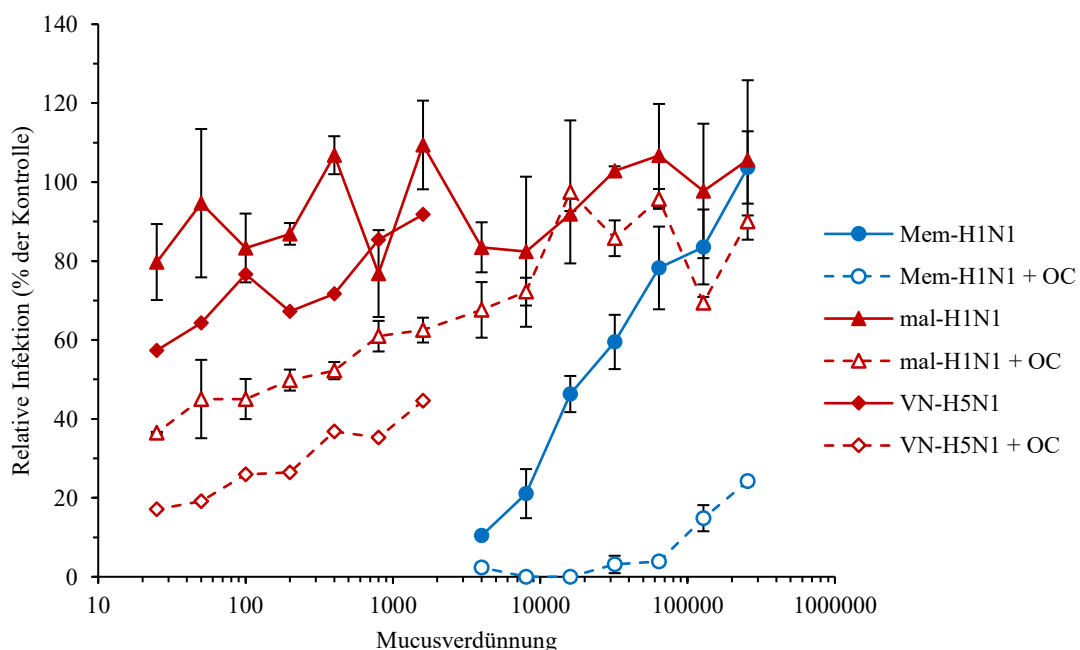


Abbildung 4.5: Inhibition rekombinanter Viren durch humanen bronchialen Mucus (HTBE-1) in An- und Abwesenheit des NA-Inhibitors Oseltamivircarboxylat (+ OC) in MDCK-Zellen. Dieses Experiment wurde wie in 3.5.5.1 beschrieben durchgeführt. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten; angegeben ist der Mittelwert von zwei Replikaten sowie deren Standardabweichung; als Kontrolle diente die Infektion in Abwesenheit von Mucus.

Die NA beeinflusst die Sensitivität der IAV gegenüber Mucus (Cohen et al., 2013). Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Inhibition durch unterschiedliche NA-Aktivitäten hervorgerufen werden, wurde die Inhibition in Anwesenheit des NA-Inhibitors Oseltamivircarboxylat (OC) untersucht (s. 3.5.6.2).

Die Infektion der aviären Viren wurde in Anwesenheit von OC und bronchialen Mucus um ca. 40 % im Vergleich zur Infektion in Abwesenheit von OC verringert. Beim humanen Virus Mem-H1N1 betrug dieser Unterschied 60 %. Beim humanen Virus Mem-H1N1 stellte sich eine

komplette Hemmung der Infektion bei einer Mucus-Verdünnung von 1:64.000 in Anwesenheit von OC ein, während bei ungehemmter NA eine komplette Inhibition erst bei einer Mucus-Verdünnung von 1:4.000 zu beobachten war (s. Abb. 4.5). Im Gegensatz dazu wurde die Infektion des aviären und des zoonotischen Virus selbst bei gehemmter NA nicht vollständig durch den Mucus inhibiert.

Die Hemmung der NA durch die Zugabe von OC führt zu einer erhöhten Sensitivität humaner und aviärer Viren gegenüber Mucus (s. Abb. 4.5). Dieses Experiment zeigt auch, dass die NA-Aktivität den inhibitorischen Effekt des Mucus beeinflusst. Jedoch erklären die Unterschiede in der NA-Aktivität nicht die starke Hemmung des humanen Virus Mem-H1N1 im Vergleich zu den beiden Viren mal-H1N1 und VN-H5N1.

4.3.5 Vergleich der Virusneutralisation durch bronchialen Mucus in MDCK- und MDCK-SIAT-Zellen

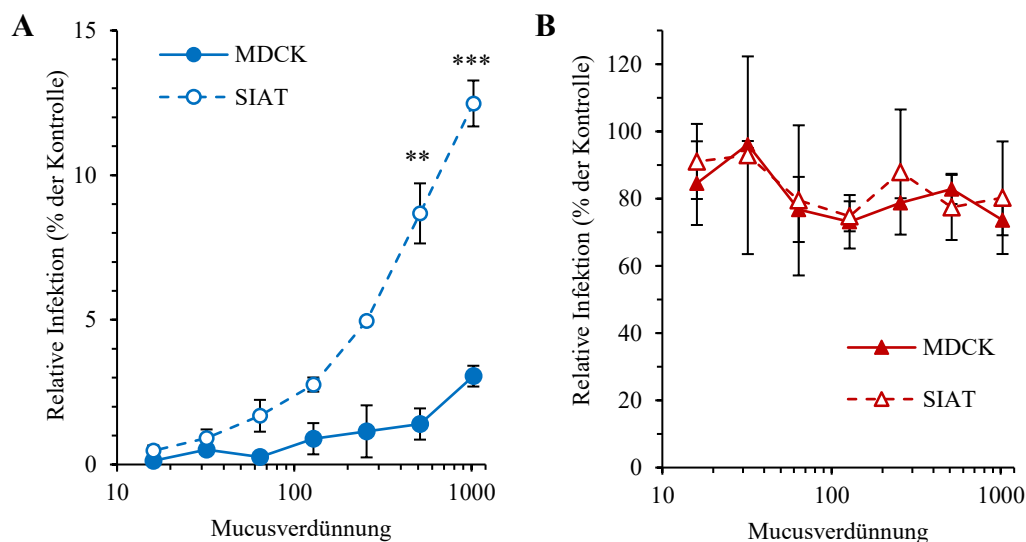


Abbildung 4.6: Neutralisation durch humanen bronchialen Mucus in MDCK- und MDCK-SIAT-Zellen. A) Mem-H1N1; B) Mal-H1N1, repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten; angegeben ist der Mittelwert von drei Replikaten sowie deren Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* im Vergleich zur Infektion in MDCK-Zellen ermittelt (s. 3.7).

MDCK-SIAT-Zellen exprimieren die 2,6-Sialyl-Transferase, welche $\alpha 2$ -3-verknüpfte Sialinsäuren in $\alpha 2$ -6 verknüpfte Sialinsäuren umwandelt (Matrosovich et al., 2003). Dadurch wird die Anzahl der humanen Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöht. Es sollte überprüft werden, inwiefern eine Erhöhung der humanen Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Virusneutralisation beeinflusst.

In MDCK-SIAT-Zellen weist das Virus Mem-H1N1 eine verringerte Sensitivität gegenüber bronchialem Mucus auf als in nativen MDCK-Zellen (s. Abb. 4.6 A) wohingegen die Inhibition des Virus mal-H1N1 keinen Unterschied in den beiden Zelllinien aufweist (s. Abb. 4.6 B).

Trotz einer Erhöhung der humanen Rezeptoren bleibt das humane Virus deutlich sensibler gegenüber bronchialem Mucus als das aviäre Virus.

4.3.6 Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in Calu3-Zellen

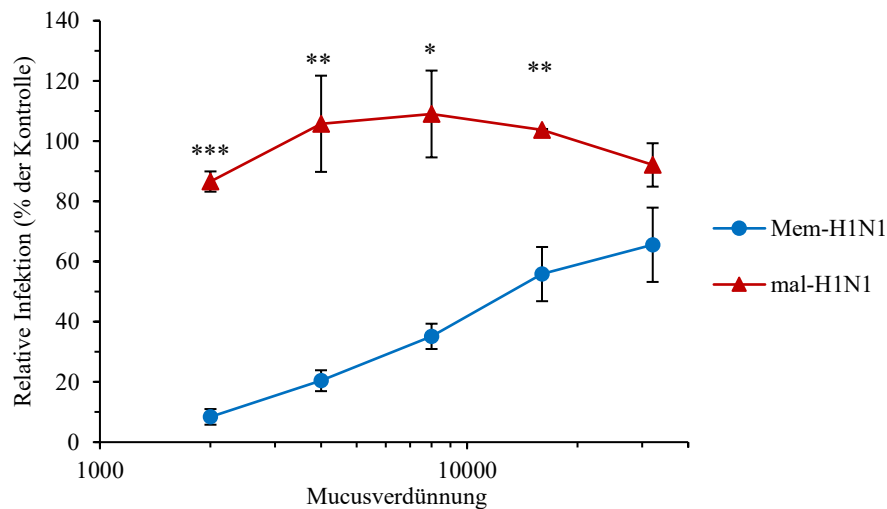


Abbildung 4.7: Inhibition der Virusinfektion durch humanen bronchialen Mucus (HTBE-1) in Calu3-Zellen. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten; angegeben ist der Mittelwert sowie das 95 %-Konfidenzintervall. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* gegen das Virus Mem-H1N1 bestimmt (s. 3.7).

MDCK-Zellen sind eine Zelllinie aus der Niere eines Hundes und exprimieren sowohl α 2-6-verknüpfte als auch α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren. Deswegen sollte die Inhibition in einem relevanteren Zellsystem, welches a) humanen Ursprungs ist und b) von dem berichtet wurde, dass es mehr α 2-6-verknüpfte als α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren exprimiert (Hsu et al., 2011). Aus diesem Grund wurde die Inhibition durch bronchialen Mucus in Calu3-Zellen untersucht.

Im Vergleich zu MDCK-Zellen zeigte das Virus Mem-H1N1 eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Mucus HTBE-1 in Calu3-Zellen (s. Abb. 4.7). Für das aviäre Virus mal-H1N1 zeigten sich keine Unterschiede zur Inhibition in MDCK-Zellen. Auch in humanen Calu3-Zellen war das Virus Mem-H1N1 sensibler gegenüber bronchialem Mucus als das Virus mal-H1N1 (s. Abb. 4.7), jedoch ist diese Inhibition nicht so stark ausgeprägt wie in MDCK-Zellen.

4.3.7 Vergleich der Virusinhibition durch humanen bronchialen Mucus in HTBE-Kulturen und MDCK-Zellen

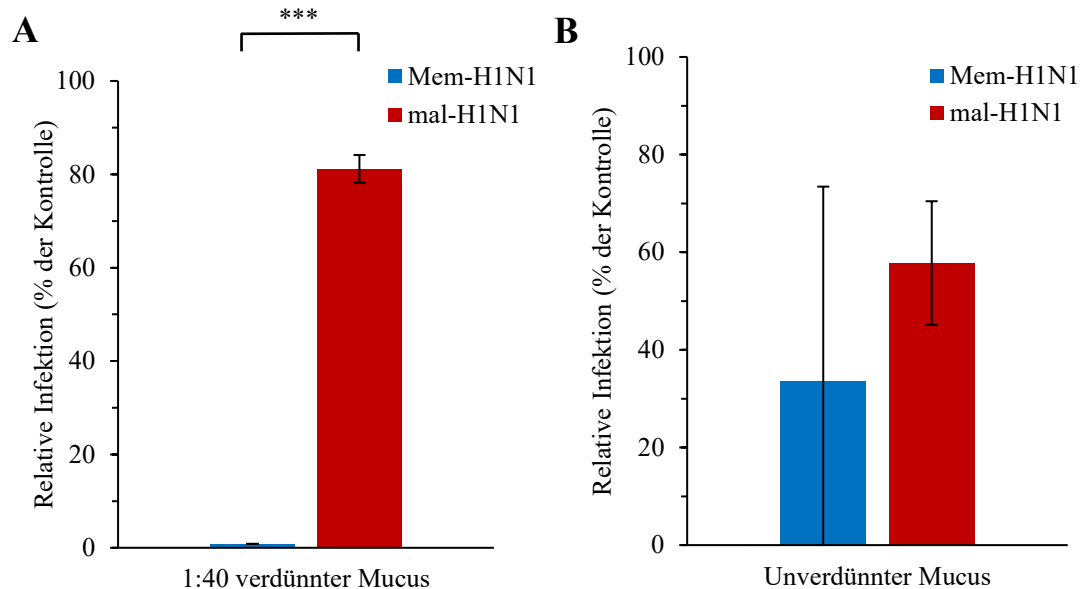


Abbildung 4.8: Inhibition der Virusinfektion durch humanen bronchialen Mucus in A) MDCK-Zellen und B) HTBE-Kulturen. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten; angegeben ist der Mittelwert von zwei Replikaten sowie deren Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* bestimmt (s. 3.7).

Die Ergebnisse der Mucushinhibition in SIAT- und Calu3-Zellen lassen darauf schließen, dass das Zellsystem einen signifikanten Einfluss auf die Inhibition haben kann. Im Menschen replizieren IAV im tracheo-bronchialen Epithel, dessen Zellen hauptsächlich α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren exprimieren (Nicholls et al., 2007). Die meisten Labor-Zelllinien repräsentieren nicht die Verteilung der Sialinsäuren dieses Epithels. Das bekannteste Modellsystem des humanen Respirationstraktes sind ausdifferenzierte HTBE-Kulturen, die unter *Air-Liquid-Interface*-Bedingungen gewonnen werden. HTBE-Kulturen sind primäre Zellen aus dem tracheo-bronchialen Epithel. In diesem Versuch sollte untersucht werden, wie sich der Mucus auf die Infektion in einem der natürlichen Situation nachempfundenen System auswirkt (s. 3.5.5). Zum Vergleich wurden MDCK-Zellen in Anwesenheit der gleichen Mucusprobe infiziert. Dabei wurde in HTBE-Kulturen unverdünnter Mucus verwendet, da die natürliche Situation, die bei der Infektion des tracheo-bronchialen Epithels vorliegt, simuliert werden sollte. Zusätzlich dazu muss die Infektionsdosis im Vergleich zu MDCK-Zellen erhöht werden, da die Virustiter in HTBE-Kulturen niedriger sind.

Der Unterschied zwischen den beiden Viren mal-H1N1 und Mem-H1N1 war in HTBE-Kulturen weniger stark ausgeprägt als in MDCK-Zellen (s. Abb. 4.8). In MDCK-Zellen wurde das Virus

Mem-H1N1 komplett gehemmt, wohingegen das Virus mal-H1N1 nur schwach gehemmt wurde (s. Abb. 4.8 A).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass humane und aviäre IAV im menschlichen Respirationstrakt gleich stark durch bronchialen Mucus gehemmt werden.

4.3.8 Bindungsinhibition durch nasalen und bronchialen Mucus

Dieser Versuch diente der Untersuchung der Bindung von humanem Mucus unterschiedlichen Ursprungs an IAV. Zur Bestimmung der Bindung wurde der Fetuin-Bindungsinhibitions-Assay verwendet (s. 3.5.7.3). Das Prinzip dieses Versuches beruht auf der kompetitiven Inhibition der Bindung des HRP-gekoppelten Fetuins an immobilisierte Viren durch verschiedene Mucusprouben. Als Kontrolle wurden die Polymere p6'SLN und p3'SLN als Inhibitoren verwendet, die entweder den aviären (p3'SLN) oder den humanen (p6'SLN) Rezeptor auf der Oberfläche aufweisen.

Die bronchialen Mucusprouben HTBE-1 und HTBE-2 (s. 2.11) inhibierten die Fetuinbindung seitens des Virus mal-H1N1 effektiver als der nasale Mucus, der in diesem Fall von einem Freiwilligen stammte (s. Abb. 4.9 A). Das Polymer p3'SLN zeigte eine mit dem nasalen Mucus vergleichbare inhibitorische Wirkung, wohingegen es zu keiner Inhibition seitens des p6'SLN-Polymers kam.

Das Virus Mem-H1N1 wurde effektiv durch Mucus HTBE-1 und HTBE-2 gehemmt (s. Abb. 4.9 B). Der nasale Mucus inhibierte wie auch schon beim Virus mal-H1N1 weniger effizient die Fetuinbindung. Es erfolgte keine Hemmung durch das Polymer p3'SLN. Die Hemmung durch das Polymer p6'SLN war vergleichbar mit der inhibitorischen Wirkung durch die beiden bronchialen Mucusprouben.

Sowohl das humane Virus Mem-H1N1 als auch das aviäre Virus mal-H1N1 binden an Mucus. Somit sollten die Infektion beider Viren durch Mucus inhibiert werden. Die verminderte Inhibition der nasalen Mucusproube im Vergleich zu den HTBE-Prouben könnte auf eine höhere Verdünnung dieser Proube zurückzuführen sein. Die Inhibition durch die Polymere deuten darauf hin, dass das Virus Mem-H1N1 durch α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren und das Virus α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren inhibiert werden.

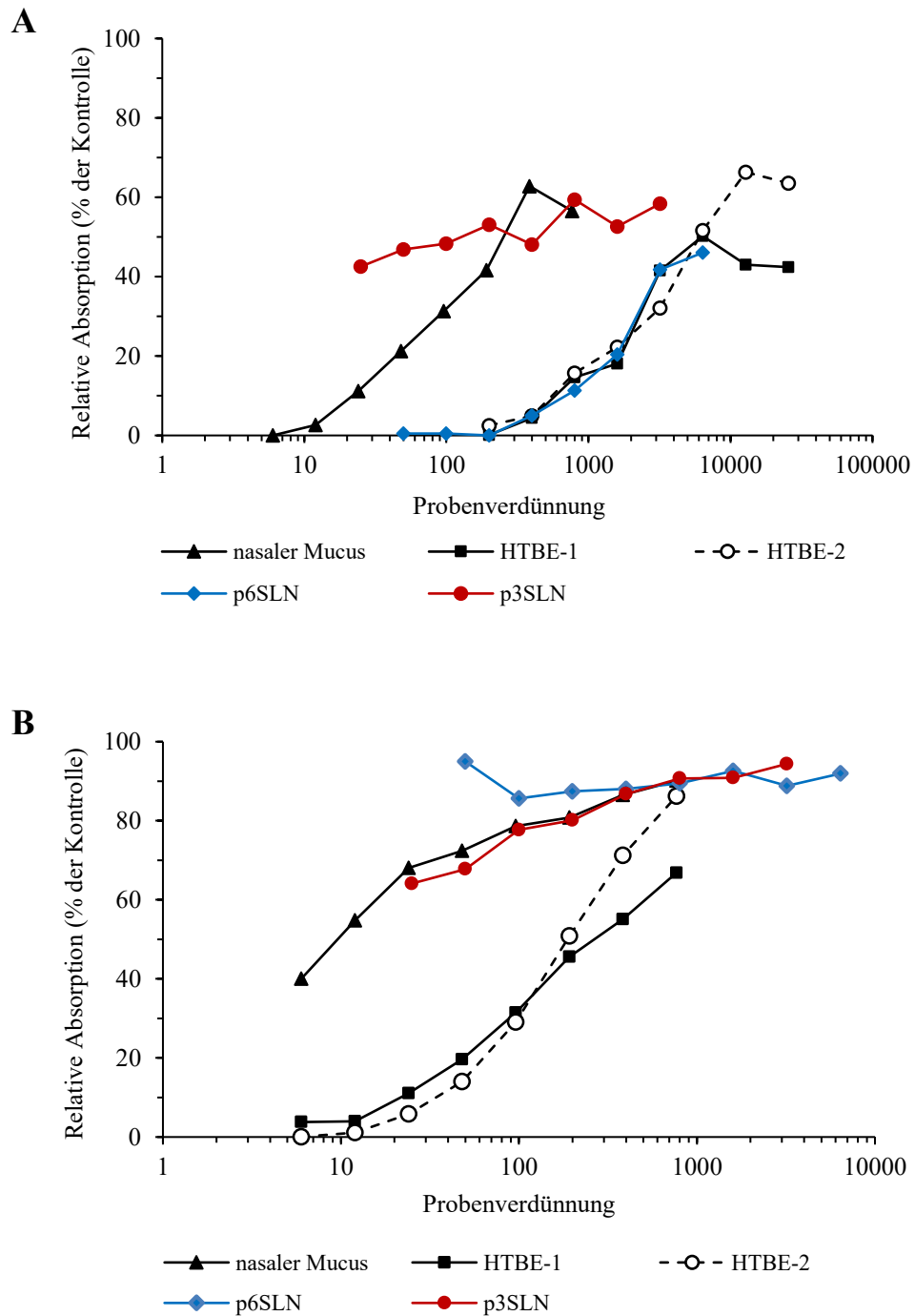


Abbildung 4.9: Bindungsinhibition durch nasalen und bronchialen (HTBE-1, HTBE-2) Mucus. A) Mem-H1N1, B) mal-H1N1; angegeben ist die relative Absorption in Bezug von gebundenem HRP-gekoppelten Fetuin im Vergleich zur Absorption in Abwesenheit von Mucus. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Charakterisierung von bronchialen und nasalen Mucusproben

4.4.1 Inhibitorische Komponenten im Mucus

Um zu untersuchen, ob im bronchialen Mucus sialinsäurehaltige Inhibitoren, hitzesensitive β -Inhibitoren oder andere Inhibitoren vorhanden sind, wurde die Mucusprobe HTBE-1 auf unterschiedliche Arten vorbehandelt (s. 3.6.4). Zum einen wurde der Mucus für 1 h bei 37°C mit der NA von *V. cholerae* inkubiert, um sialinsäurehaltige Inhibitoren zu inaktivieren. Weiterhin wurde der Mucus bei 62°C inkubiert, um β -Inhibitoren zu inaktivieren. Die vorbehandelten Proben wurden anschließend im Fetuin-Bindungs-Inhibitions-Assay, wie zuvor beschrieben, auf ihre inhibitorische Wirkung getestet (s. 3.5.7.3). Um die Wirkung der verschiedenen Komponenten auf aviäre und humane Viren zu vergleichen wurden die Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1 getestet.

Der unbehandelte und der bei 62°C inkubierte Mucus hemmten die Fetuinbindung des Virus Mem-H1N1 fast komplett (s. Abb. 4.10 A). Lediglich bei der höchsten Mucusverdünnung war eine reduzierte Inhibition messbar. Die NA-Behandlung des Mucus reduzierte deutlich die inhibitorische Wirkung des Mucus, wenn auch nicht vollständig.

Auch beim Virus mal-H1N1 veränderte die Hitzebehandlung des Mucus die inhibitorische Wirkung des Mucus kaum (s. Abb. 4.10 B). Wurde der Mucus jedoch mit der NA von *V. cholerae* vorbehandelt, konnte man keine Inhibition der Bindung feststellen.

Die Inhibition der Fetuinbindung durch Mucus ist somit abhängig von Sialinsäuren und unabhängig von hitzesensitiven Komponenten.

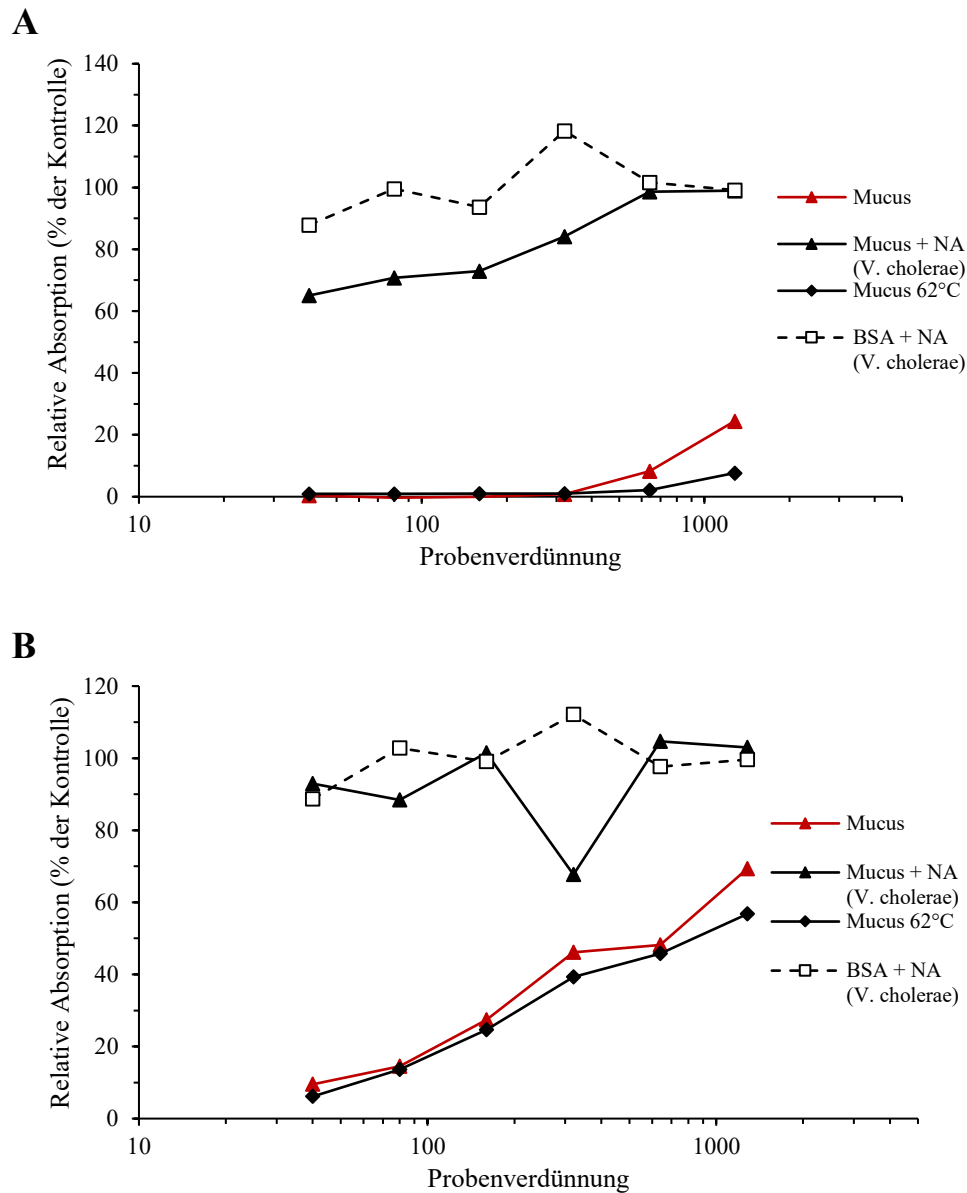


Abbildung 4.10: Relative Bindung eines HRP-Fetuius in Anwesenheit unterschiedlich vorbehandelter humaner bronchialer Mucusproben (HTBE-1). A) Mem-H1N1 und B) mal-H1N1. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4.4.2 Fraktionierung des Mucus

Exosomen sind Membranvisikel, die auch in Mucusproben aus HTBE-Kulturen vorkommen können. Es wurde beschrieben, dass Exosomen durch die Anwesenheit von α 2-6-verknüpften Sialinsäuren auf ihrer Membran einen inhibitorischen Einfluss auf die Infektion humaner IAV haben können (Kesimer et al., 2009). Exosomen können durch eine Differentialzentrifugation isoliert werden und treten dabei im Pellet der Ultrazentrifugation auf. Durch die Fraktionierung des Mucus sollte überprüft werden, ob die Inhibitoren aviärer und humaner Viren in unterschiedlichen Mucusfraktionen auftreten, wie zum Beispiel der exosomenhaltigen Fraktion. Dabei wurden drei Fraktionen erstellt (s. 3.6.3): das Pellet der *Low-Speed*-Zentrifugation (LZ-Pellet), das Pellet der Ultrazentrifugation (UZ-Pellet) und der Überstand der Ultrazentrifugation (UZ-Überstand). Die unterschiedlichen Fraktionen wurden ebenso wie der unbehandelte Mucus hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber den Viren mal-H1N1, Mem-H1N1 und VN-H5N1 im Fetuin-Bindungs-Inhibitionsassay getestet (s. 3.5.7.3). Eine Mucusprobe wurde von HNE-Kulturen isoliert (HNE-Mucus), eine Mucusprobe wurde von einem Freiwilligen zur Verfügung gestellt (nasaler Mucus) und zwei Mucusproben wurden von HTBE-Kulturen isoliert (HTBE-3, HTBE-4).

In diesem Versuch zeigte sich ein Unterschied zwischen der Inhibition aviärer und humaner Viren. Die Inhibition durch den nasalen Mucus wird für das Virus Mem-H1N1 vermehrt durch das UZ-Pellet vermittelt, während dies bei den aviären Viren vermehrt durch den UZ-Überstand vermittelt wird (s. Abb. 4.11 A und B). Diese Unterschiede bestehen bei den bronchialen Mucusproben, HTBE-3 und HTBE-4, nicht zwischen aviären und humanen Viren (s. Abb. 4.11 C und D). Aviäre und humane Viren werden hier hauptsächlich durch den UZ-Überstand inhibiert. Das LZ-Pellet zeigte keine inhibitorische Wirkung gegenüber den rekombinanten Viren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition in Mucus aus HTBE-Kulturen hauptsächlich durch lösliche Proteine vermittelt wird. Im nasalen Mucus wird die Inhibition sowohl durch lösliche Komponenten vermittelt, kann aber wie im Falle von Mem-H1N1 vermehrt durch nicht lösliche Komponenten vermittelt werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Mucusproben können unterschiedliche Ursachen haben, so wurden die Mucusproben von verschiedenen Donoren und auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt, was einen Einfluss auf die Zusammensetzung haben kann.

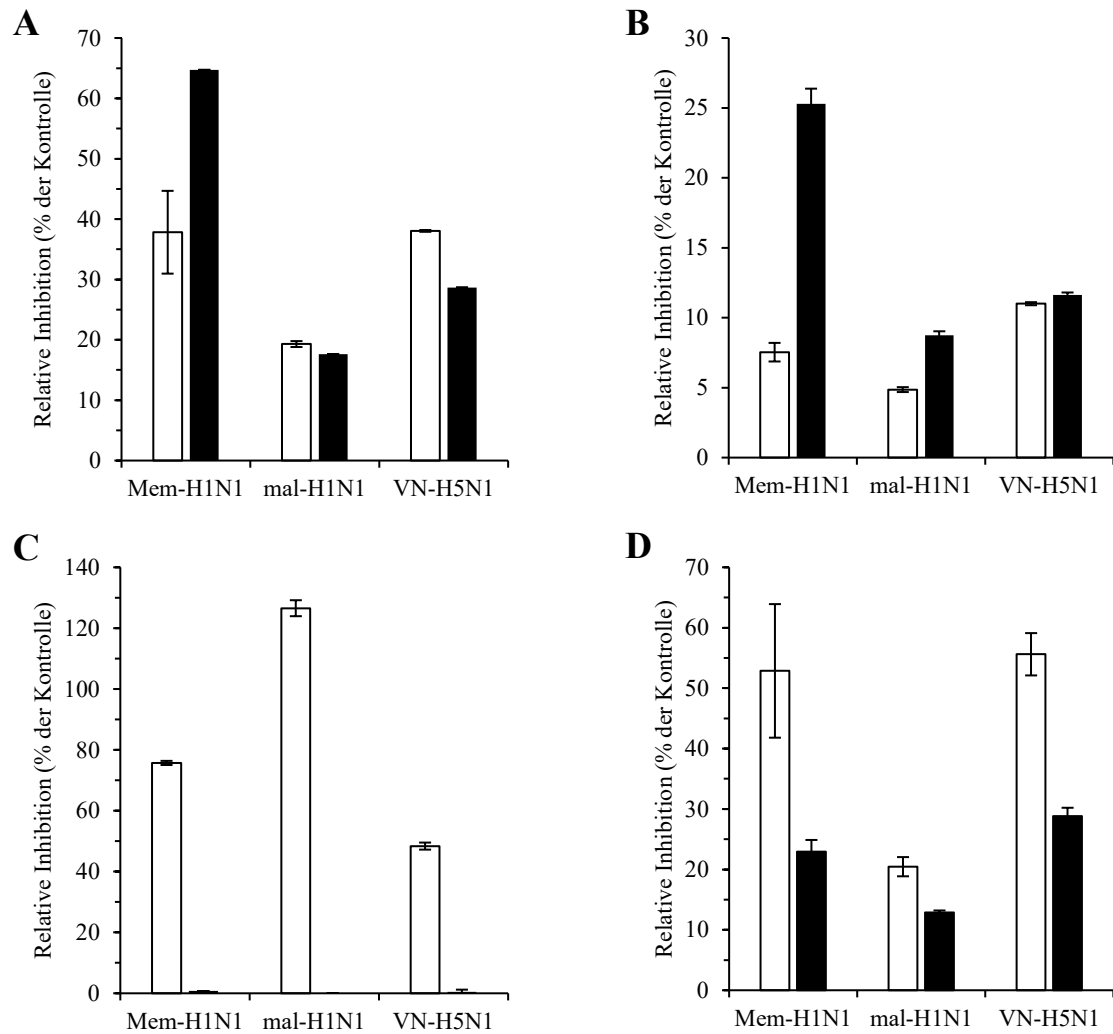


Abbildung 4.11: Virusinhibition durch den UZ-Überstand (weiß) und das UZ-Pellet (schwarz) verschiedener Mucusproben. A) nasaler Mucus, B) HNE-Mucus, C) HTBE-3, D) HTBE-4. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten; angegeben ist die relative inhibitorische Wirkung in Bezug zur maximalen inhibitorischen Wirkung des unbehandelten Mucus.

4.5 Einfluss des HAs und der NA auf die Sensitivität der Viren gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

Als eine der ersten Reaktionen auf eine virale Infektion sezernieren infizierte Zellen Typ I-Interferone (IFN), welche den antiviralen Status von Zellen induzieren. Bei IFN-Stimulation werden von den Zellen unter anderem antivirale Effektormoleküle produziert, die verschiedene Einflüsse auf den viralen Replikationszyklus haben können (s. 1.7.2).

Um den Einfluss der Glykoproteine HA und NA gegenüber dem antiviralen Status zu untersuchen, wurden Zellen mit IFN- β vorstimuliert und anschließend mit 2:6-rekombinanten Viren infiziert. Dabei wurde zunächst die einzyklische Replikation in Anwesenheit von IFN- β beobachtet, um auf die initialen Schritte der Infektion zu fokussieren und Einflüsse von IFN-induzierten Effektormolekülen auf die Viruszusammensetzung, Abknospung und Ausbreitung auszuschließen (s. 3.4.1).

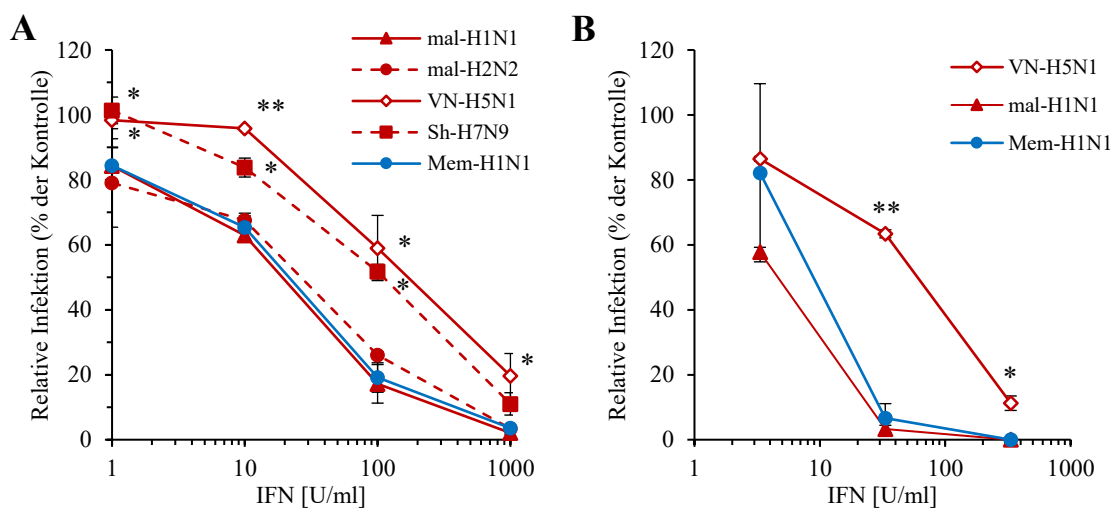


Abbildung 4.12: Inhibition der Infektion rekombinanter 2:6-Viren nach IFN-Stimulation von A) A549-Zellen und B) Calu3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- β inkubiert. Anschließend wurden sie mit 200 FFU Virus infiziert. Infizierte Zellen wurden mit einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert. Repräsentatives Ergebnis von fünf (A) bzw. 2 (B) unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die 95 %-Konfidenzintervalle; die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* im Vergleich zum Virus Mem-H1N1 bestimmt (s. 3.7).

Die Infektion aller Viren wird durch die IFN- β -Stimulation der A549-Zellen dosisabhängig gehemmt (s. Abb. 4.12 A). Dabei wurde die Infektion der Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 weniger stark gehemmt als die Infektion der anderen Viren Mem-H1N1, mal-H1N1 und mal-H2N2 (s. Abb. 4.12 A).

Um auszuschließen, dass der in A549-Zellen beobachtete Effekt zelltypspezifisch ist, wurde die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten Status der rekombinanten Viren in einer weiteren humanen Zelllinie, Calu3-Zellen, bestimmt (s. 3.5.8.1). Auch in diesem Zellsystem wird

die Infektion aller getesteten Viren durch eine IFN- β -Stimulation der Zellen gehemmt (s. Abb. 4.12 B). Dabei zeigte das Virus VN-H5N1 wieder eine verringerte Sensitivität gegenüber IFN- β im Vergleich zu den anderen getesteten Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1. Somit wurden die Ergebnisse aus den A549-Zellen bestätigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sensitivität von IAV gegenüber IFN- β abhängig von den Glykoproteinen HA und NA sein kann. Aufgrund der Zusammensetzung der rekombinanten Viren (s. 4.1) können die beobachteten Unterschiede auf Unterschiede in der Rezeptorbindung, dem Fusions-pH oder auch der NA zurückzuführen sein. Dabei scheint keine Korrelation zwischen der Inhibition der Infektion und der Rezeptorspezifität der Viren zu bestehen, da das Virus Mem-H1N1 und die Viren mal-H1N1 und mal-H2N2 gleich stark inhibiert werden. Vielmehr scheint dieser Effekt mit dem Fusions-pH zu korrelieren, da die beiden Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 einen höheren Fusions-pH aufweisen als die anderen drei Viren (s. Tab. 4.2).

4.6 Einfluss der HA-vermittelten Fusion auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

Die Sensitivität von Viren gegenüber dem antiviralen Status scheint mit dem pH-Optimum der Fusion zu korrelieren. Es ergibt sich daraus die Hypothese, dass ein hohes pH-Optimum der Fusion die Inhibition von IAV durch IFN-induzierte Effektormoleküle reduziert.

4.6.1 Herstellung rekombinanter Viren mit Fusions-pH beeinflussenden Punktmutationen im HA

Um den Einfluss des Fusions-pH auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status zu untersuchen, wurden rekombinante Viren mit Fusions-pH-beinflussenden Mutationen im HA des Virus A/Hong Kong/1/1968 mittels des Acht-Plasmid-Systems hergestellt (s. 3.3). Dabei wurden die den Fusions-pH erhöhenden Mutationen H17₁R (Rott et al., 1984) und K82₂T (Lin et al., 1997), sowie die den Fusions-pH absenkende Mutation H17₁Y (Thoennes et al., 2008) eingefügt (s. 3.1.3). Die Identität der Viren und das Vorhandensein der Mutationen wurden mittels Sanger-Sequenzierung des HAs und der NA (s. 3.1.5) bestätigt. Die Titer der Viren wurden sowohl mittels einzyklischer Replikation auf MDCK- und A549-Zellen (s. 3.4.1) als auch im Plaque-Assay (s. 3.4.2) bestimmt. Die Unterschiede in den Fusionseigenschaften wurden anschließend in zwei Experimenten untersucht.

4.6.2 Detektion der pH-induzierten Konformationsänderung

Zur Überprüfung des Einflusses der Mutationen wurde der pH der Konformationsänderung untersucht (s. 3.5.3). Im Vergleich zum Virus HK/68-WT wiesen die Viren HK/68-K82T und HK/68-H17R einen höheren pH_{50} der Konformationsänderung auf (s. Tab. 4.3). Das Virus HK/68-H17Y hingegen zeigt einen geringeren pH_{50-HA} der Konformationsänderung im Vergleich zum Virus HK/68-WT. Das Virus HK/68-H17R besitzt den höchsten pH der Konformationsänderung.

4.6.3 Sensitivität gegenüber NH_4Cl

Um den Einfluss der Punktmutationen auf den endosomalen Viruseintritt zu bestätigen, wurde die Inhibition der Infektion durch die lysotrope Substanz NH_4Cl untersucht (s. 3.5.2). Dabei zeigten die Viren HK/68-K82T und HK/68-H17R im Vergleich zum Virus HK/68-WT eine geringere Sensitivität gegenüber NH_4Cl auf (s. Tab. 4.3). Das Virus HK/68-H17Y hingegen wies im Vergleich zu HK/68-WT eine höhere Sensitivität auf.

Die Sensitivität gegenüber NH_4Cl sowie der pH_{50} der Konformationsänderung zeigen, dass das Virus HK/68-H17R den höchsten Fusions-pH aufweist, gefolgt vom Virus HK/68-K82T. Das Virus HK/68-H17Y weist den niedrigsten Fusions-pH auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den schon vorab publizierten Daten dieser Mutationen überein.

Tabelle 4.3: Fusionseigenschaften der rekombinanten HK/68 Viren. MW: Mittelwert; KI: 95 %-Konfidenzintervall; P: p-Wert aller Replikate des zweiseitigen *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus HK/68-WT; n.b.: Wert wurde in diesem Experiment nicht bestimmt; (n): Anzahl der Replikate.

Virus	pH der Konformationsänderung (pH_{50-HA})			IC ₅₀ (NH_4Cl , mM)		
	MW	KI (n)	P	MW	KI (n)	P
<i>HK/68-WT</i>	4,9	±0,03 (13)		0,317	±0,026 (12)	
<i>HK/68-H17R</i>	5,3	±0,15 (7)	0,000	1,003	±0,173 (11)	0,000
<i>HK/68-H17Y</i>	4,7	±0,05 (7)	0,000	0,254	±0,028 (11)	0,006
<i>HK/68-K82T</i>	5,1	±0,04 (7)	0,000	0,814	±0,042 (9)	0,000
<i>HK/68-Y98F</i>	n.b.			0,388	±0,040 (10)	0,006
<i>HK/68-R2</i>	n.b.			0,353	±0,015 (8)	0,107

4.6.4 Bestimmung der Sensitivität von rekombinanten Fusionsmutanten gegenüber IFN- β

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die HK/68-Mutanten sich in ihren Fusions Eigenschaften unterscheiden, wurde die Sensitivität dieser Viren gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status untersucht (s. 3.5.9).

Die Infektion der Viren HK/68-WT und HK/68-H17Y wurde in mit IFN- β vorstimulierten A549-Zellen gleich stark inhibiert (s. Abb. 4.13 A). Dahingegen zeigten die beiden Viren HK/68-K82T und HK/68-H17R eine verringerte Sensitivität gegenüber der IFN- β -Vorbehandlung der A549-Zellen. Dabei wies das Virus HK/68-H17R die geringste Sensitivität gegenüber IFN- β auf.

Auch in Calu3-Zellen weisen die beiden Viren HK/68-WT und HK/68-H17Y eine höhere Sensitivität gegenüber IFN- β auf als das Virus HK/68-H17R (s. Abb. 4.13 B).

Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass die Sensitivität von IAV gegenüber IFN- β durch den Fusions-pH der IAV beeinflusst wird. Viren mit einem hohen Fusions-pH sind weniger sensitiv als Viren mit einem niedrigen Fusions-pH.

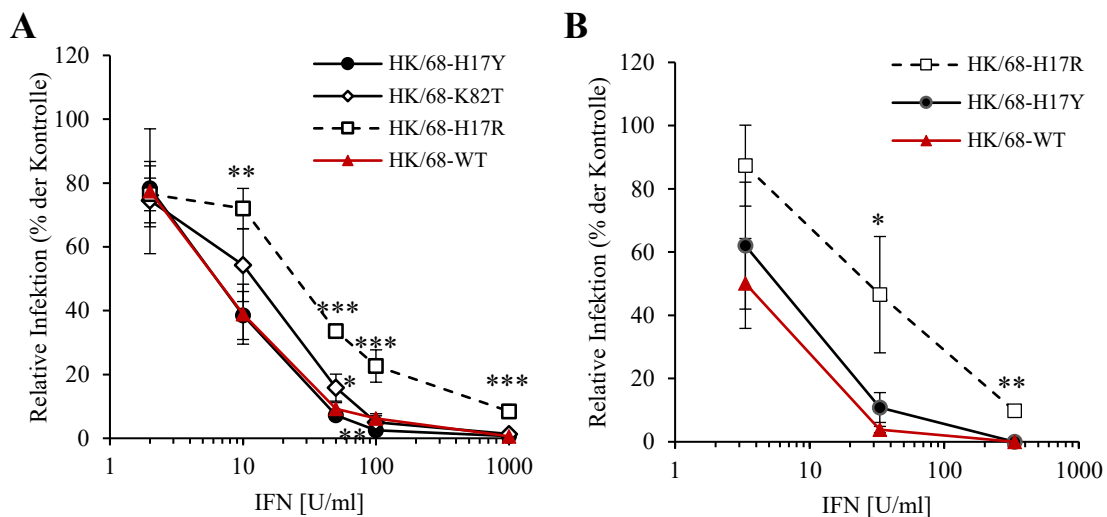


Abbildung 4.13: Inhibition der Infektion rekombinanter Fusionsmutanten in IFN-vorstimulierten A) A549-Zellen und B) Calu3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- β inkubiert. Anschließend wurden sie mit 200 FFU Virus infiziert. Infizierte Zellen wurden mit einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert. Repräsentatives Ergebnis von fünf (A) bzw. 2 (B) unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Mittelwerte von drei (A549) bzw. zwei (Calu3) Replikaten eines repräsentativen Experiments sowie die 95 %-Konfidenzintervalle; die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's-T-Test* in Bezug auf das Virus HK/68-WT bestimmt (s. 3.7)

4.6.5 Inhibition der Infektion durch IFN-induzierte Effektormoleküle in primären HAEC- und ausdifferenzierten HTBE-Kulturen

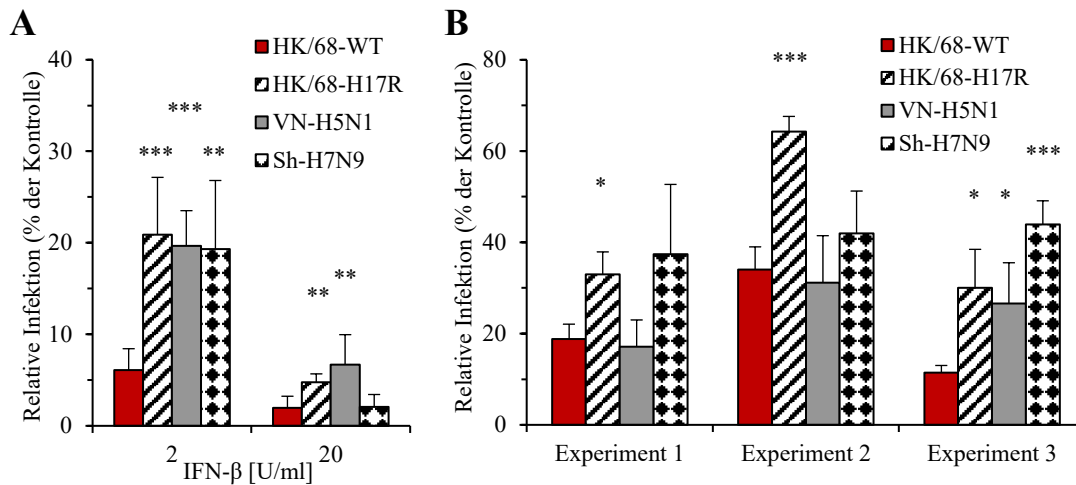


Abbildung 4.14: Sensitivität rekombinanter Viren gegenüber IFN-β in A) HAEC-;B) HTBE-Kulturen. Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen, im Falle der HTBE-Kulturen mit 20 U/ml, von IFN-β inkubiert. HAEC-Zellen wurden mit 2×10^4 FFU der Viren pro Kultur infiziert. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung zweier Experimente mit jeweils drei Replikaten ($n=6$). HTBE-Kulturen wurden mit 6×10^5 FFU der Viren pro Kultur infiziert. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung jedes Experiments mit jeweils 3 bis 4 Replikaten. 8 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und infizierte Zellen wurden mit einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* im Vergleich zum Virus HK/68-WT ermittelt (s. 3.7).

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte in den Standardzelllinien A549 und Calu3 in einem der natürlichen Situation nachempfundenen System reproduzierbar sind, wurden primäre HTBE- und HAEC-Kulturen mit IFN-β vorstimuliert und mit den rekombinanten Viren infiziert (s. 3.5.8.2). Dafür wurden die zoonotischen Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 sowie das Virus HK/68-WT und seine Mutante mit höherem Fusions-pH, HK/68-H17R, verwendet.

In HAEC-Kulturen wies das Virus HK/68-WT die größte Sensitivität gegenüber der IFN-Stimulation der Zellen auf (s. Abb. 4.14 A). Die Viren HK/68-H17R, VN-H5N1 und Sh-H7N9, welche einen höheren Fusions-pH als das Virus HK/68-WT aufweisen, zeigten eine geringere Sensitivität gegenüber IFN-β-induzierten Effektormolekülen.

In HTBE-Kulturen wurden drei Experimente durchgeführt. Die Kulturen stammten dabei von verschiedenen Donoren. In allen drei Experimenten zeigte das Virus HK/68-H17R eine geringere Sensitivität gegenüber der IFN-Behandlung als das Virus HK/68-WT (s. Abb. 4.14 B). Die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 zeigten nur in einem von drei Experimenten eine verringerte Sensitivität gegenüber der IFN-Vorbehandlung im Vergleich zum Virus HK/68-WT (s. 4.14 B, Experiment 3).

Die Experimente aus den A549- und Calu3-Zellen konnten somit in HAEC-Kulturen reproduziert werden. In HTBE-Kulturen konnten die Ergebnisse nur teilweise reproduziert werden. HK/68-WT und seine Mutante HK/68-H17R zeigten jedoch in allen vier getesteten Zellsystemen die gleiche relative Sensitivität gegenüber IFN- β . Dies deutet darauf hin, dass auch in primären Zellen ein höheres pH-Optimum der Fusion die Inhibition des viralen Eintritts durch IFN-induzierte Effektormoleküle reduziert.

4.7 Einfluss der Rezeptorbindungseigenschaften auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

4.7.1 Herstellung rekombinanter Viren mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität

Inwiefern die Rezeptorspezifität einen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber dem IFN-vermittelten antiviralen Status hat, sollte mit einem weiteren Set an rekombinanten Viren untersucht werden. Dabei wurden Mutationen in das HA des Virus A/Hong Kong/1/1968 eingefügt, die die Rezeptorbindung beeinflussen (s. 3.1.3). Es wurden die Mutationen L226_IQ und S228_IG in das HA von A/Hong Kong/1/1968 eingefügt (HK/68-R2), welche die Rezeptorspezifität von $\alpha 2-6$ zu $\alpha 2-3$ ändern (Matrosovich et al., 2007). Zum anderen wurde die Mutation Y98_IF eingefügt, für die beschrieben ist, dass sie die Bindungsavidität beeinflusst (HK/68-Y98F) (Martin et al., 1998). Die rekombinanten Viren wurden mittels des Acht-Plasmid-System hergestellt (s. 3.3) und ihre Identität mittels Sanger-Sequenzierung des HA und der NA bestätigt (s. 3.1.5). Anschließend wurden die Titer der rekombinanten Viren mittels einzyklischer Replikation (s. 3.4.1) und Plaque-Titer (s. 3.4.2) bestimmt.

4.7.2 Sensitivität gegenüber NH₄Cl

Da bereits gezeigt wurde, dass der Fusions-pH die Sensitivität gegenüber IFN beeinflussen kann, wurde die Sensitivität der Viren gegenüber NH₄Cl untersucht, um einen potentiellen Einfluss der Rezeptorbindung auf die Fusionseigenschaften auszuschließen.

Zwischen dem Virus HK/68-WT und dem Virus HK/68-R2 konnte kein signifikanter Unterschied in der Sensitivität gegenüber NH₄Cl festgestellt werden. Im Gegensatz dazu besitzt das Virus HK/68-Y98F eine leicht höhere Sensitivität gegenüber NH₄Cl als das Virus HK/68-WT (s. Tabelle 4.3). Dennoch kann man davon ausgehen, dass die Viren bei einem ähnlichen pH die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran induzieren.

4.7.3 Inhibition der Infektion rekombinanter Rezeptorbindungsmutanten durch IFN-induzierte Effaktormoleküle

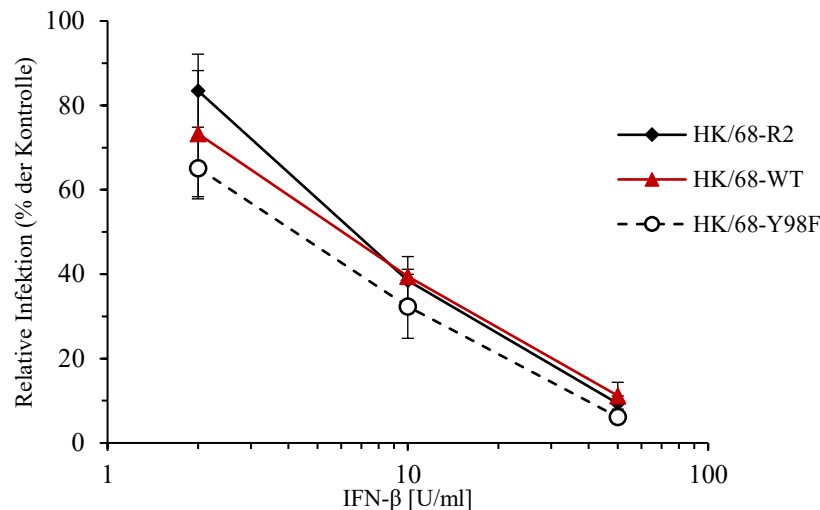


Abbildung 4.15: Inhibition der Infektion der Rezeptormutanten durch IFN in A549-Zellen. A549-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit IFN- β inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 FFU der Viren infiziert. 15 h nach der Infektion wurden infizierte Zellen durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP-Protein detektiert. Die Anzahl infizierter Zellen in Anwesenheit von IFN wurde in Relation zur Kontrolle (keine Stimulation mit IFN) gebracht. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus HK/68-WT bestimmt (s. 3.7); repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten; angegeben sind die Mittelwerte von drei Replikaten sowie die 95 %-Konfidenzintervalle.

Die Sensitivität gegenüber IFN-induzierten Effaktormolekülen der Rezeptorbindungsmutanten wurde wie zuvor schon beschrieben durchgeführt (s. 3.5.8.1). Die Rezeptorbindungsmutanten HK/68-R2 und HK/68-Y98F zeigten in mit IFN vorstimulierten A549-Zellen eine zum Virus HK/68-WT vergleichbare Inhibition der Infektion (s. Abb. 4.15). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rezeptorspezifität keinen Einfluss auf die Sensitivität der Viren gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status in A549-Zellen hat.

4.8 Einfluss der NA auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

Die rekombinanten Viren mit HAs und NAs repräsentativer humaner, aviärer und zoonotischer Viren unterscheiden sich abgesehen von ihrer Rezeptorspezifität und ihrem Fusions-pH auch in ihrer NA (s. 4.1). Die NAs dieser Viren können sich sowohl in ihrer Spezifität, Abspaltung aviärer oder humaner Rezeptoren, als auch ihrer Aktivität, Effizienz der Abspaltung, unterscheiden (s. 1.4). Um einen möglichen Einfluss der NA auf die Sensitivität von Viren gegenüber dem IFN-

induzierten antiviralen Status zu untersuchen, wurden rekombinante Viren verwendet, welche die NA von Viren aus verschiedenen Spezies besitzen (s. 2.4). Dabei enthielt das Virus pdm09 alle Gene des pandemischen Virus von 2009. Das Virus pdm09-human/Memphis enthielt die NA eines humanen saisonalen Virus, das Virus pdm09-dk/bavaria enthielt die NA eines aviären Virus. Das Virus pdm09-sw/Iowa enthielt die NA eines klassischen Schweinevirus und das Virus pdm09-Thailand die NA eines aviär-ähnlichen Schweinevirus. Diese rekombinanten Viren waren in unserer Arbeitsgruppe schon vorhanden und bereits charakterisiert worden (Gerlach et al., 2012).

4.8.1 Sensitivität rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA gegenüber NH_4Cl

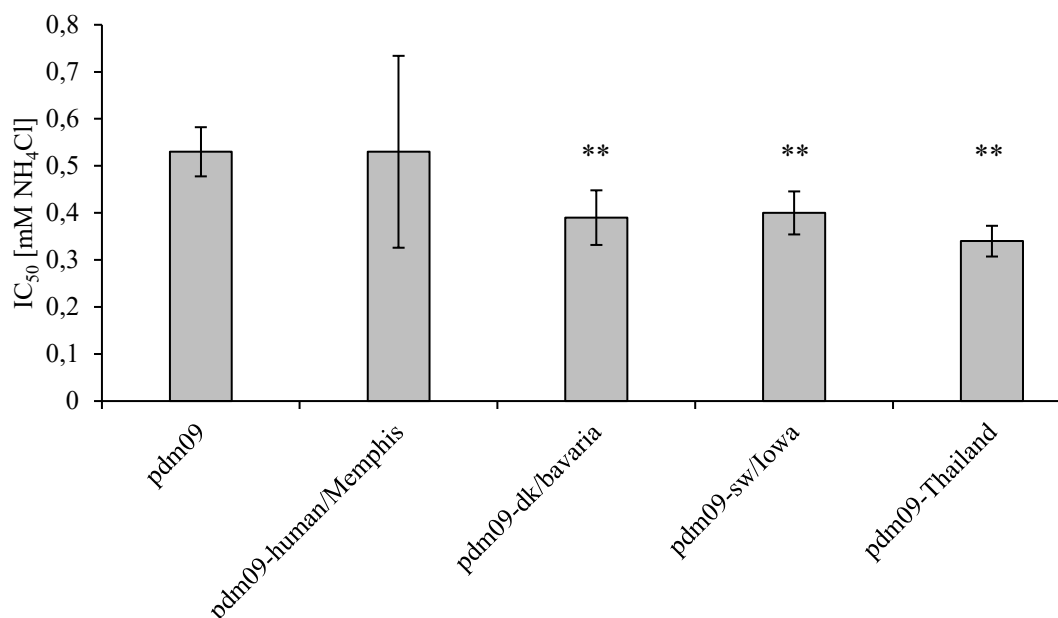


Abbildung 4.16: Inhibition der Infektion rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA durch NH_4Cl . Eine NH_4Cl -Verdünnungsreihe wurde erstellt und die Viren mit dieser Verdünnungsreihe inkubiert. MDCK-Zellen wurden mit 200 FFU der Viren infiziert und 15 h nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen das virale NP detektiert. Die IC_{50} wurde mittels linearer Interpolation ermittelt und die Mittelwerte sowie die 95 %-Konfidenzintervalle aller Experimente wurden bestimmt (n=6). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus pdm09 bestimmt (s. 3.7).

Durch Bestimmung der Virussensitivität gegenüber NH_4Cl sollte untersucht werden, ob der Austausch des NA-Gens den Fusions-pH beeinflusst (s. 3.5.2).

Die Viren pdm09 und pdm09-human/Memphis zeigten eine vergleichbare Sensitivität gegenüber NH_4Cl (s. Abb. 4.16). Dahingegen wiesen die Viren pdm09-dk/bavaria, pdm09-sw/Iowa und pdm09-Thailand eine im Vergleich zum Virus pdm09 höhere Sensitivität auf. Daraus lässt sich schließen, dass das Virus pdm09 bei einem höheren pH als die Viren pdm09-dk/bavaria, pdm09-

sw/Iowa und pdm09-Thailand die Fusion induziert. Somit kann die Herkunft der NA einen Einfluss auf den pH-abhängigen Eintritt von IAV in die Zelle haben. Es wurde bereits gezeigt, dass Änderungen in der NA-Aktivität das pH-Optimum der Fusion beeinflussen kann (DuBois et al., 2011).

4.8.2 Inhibition der Infektion rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA durch IFN-induzierte Effektormoleküle

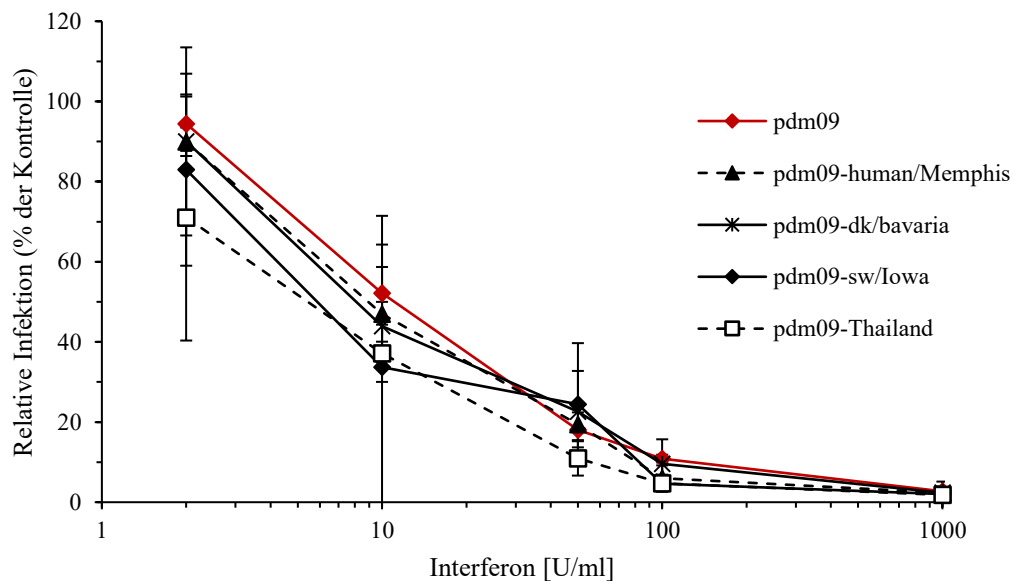


Abbildung 4.17: Inhibition der Infektion rekombinanter Viren mit unterschiedlicher NA durch IFN-induzierte Effektormoleküle in A549-Zellen. Die Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit IFN- β inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 FFU der Viren infiziert. 15 h nach der Infektion wurden infizierte Zellen durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP-Protein detektiert. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die 95 %-Konfidenzintervalle eines Experiments. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus pdm09 bestimmt (s. 3.7).

Es sollte als nächstes untersucht werden, ob der Austausch der NA auch einen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber IFN hat.

Das Virus pdm09 zeigte die geringste Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status (s. Abb. 4.17). Auch zeigte das Virus pdm09-Thailand, welches die größte Sensitivität gegenüber NH_4Cl aufweist, die größte Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status. Dieser Effekt des NA-Austauschs scheint mit dem Einfluss der NA auf die Fusion zu korrelieren. Alle anderen Viren zeigten eine intermediäre Sensitivität. Allerdings sind die Unterschiede nur gering. Somit scheint die NA nur einen geringen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber IFN zu haben, was mit ihrem geringen Einfluss auf die Fusion korreliert.

4.9 Inhibition der Infektion durch humane IFITM-Proteine

Die Beobachtung, dass die IAV-Sensitivität gegenüber IFN- β abhängig vom Fusions-pH der Viren war, führte zu der Vermutung, dass die IFN-induzierten Transmembranproteine (IFITMs) eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der initialen IAV-Infektion spielen. IFITM-Proteine inhibieren die Infektion verschiedener Virusfamilien, indem sie die virale Fusion inhibieren (Li et al., 2013). Es sollte untersucht werden, ob die Sensitivität von IAV gegenüber IFITM-Proteinen ebenfalls abhängig vom pH-Optimum der Fusion ist. Um dies zu untersuchen, wurden zwei MDCK-Zelllinien verwendet, die entweder das humane IFITM2- oder das humane IFITM3-Protein stabil exprimieren (s. 2.8). Diese Zellen wurden von unseren Kooperationspartner Professor Stefan Pöhlmann und Dr. Michael Winkler (DPZ Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die Sensitivität gegenüber den IFITM-Proteinen wurde nach mono- (s. 3.4.1) sowie nach multizyklischer Replikation (s. 3.4.2) bestimmt.

4.9.1 Sensitivität gegenüber humanem IFITM2 und IFITM3 in der frühen Replikationsphase

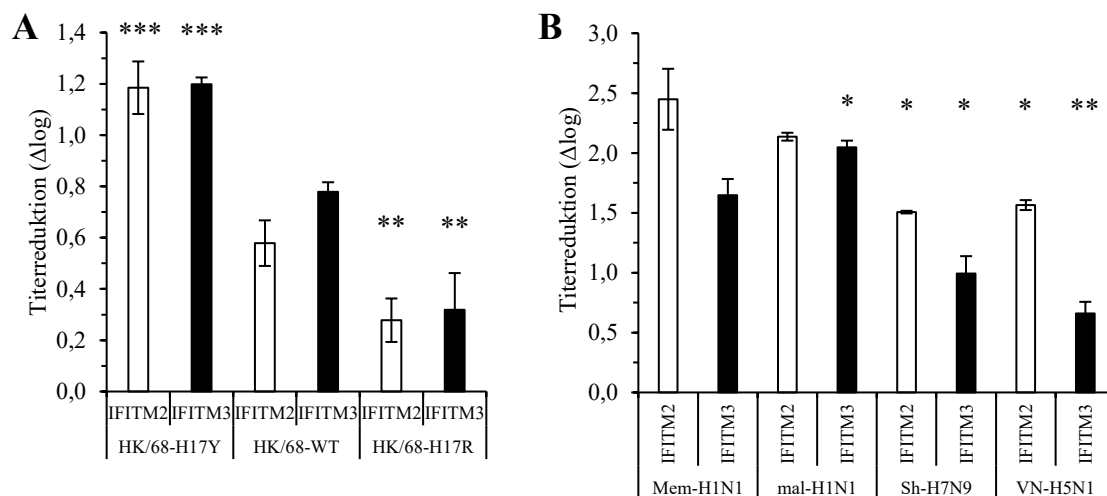


Abbildung 4.18: Titerreduktion rekombinanter Viren bei Überexpression von humanen IFITM2 (weiß) und IFITM3 (schwarz) nach einem Replikationszyklus. Die Titer in MDCK-hIFITM2 und MDCK-hIFITM3 Zellen wurden mittels einzyklischer Replikation (s. 3.4.1) bestimmt und in Relation zu den Titern in MDCK-G Zellen gesetzt. **A) Fusionsmutanten;** die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's-T-Test* in Bezug auf das Virus HK/68-WT bestimmt (n=3) (s. 3.7); **B) Viren mit HA und NA repräsentativer aviärer und humaner Viren;** die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's-T-Test* in Bezug auf das Virus Mem-H1N1 bestimmt (n=2) (s. 3.7); repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Zur Bestimmung der Virussensitivität gegenüber IFITM2 und IFITM3 beim Viruseintritt wurde die monozyklische Replikation in den drei Zelllinien MDCK-G, MDCK-hIFITM2 und MDCK-

hIFITM3 beobachtet (s. 3.4.1). Dafür wurden die rekombinanten Viren titriert und die Titer mit den Titern in der parentalen Zelllinie (MDCK-G) verglichen, die kein IFITM-Protein exprimiert. Die Infektion aller rekombinanten Viren wurde durch die Expression von IFITM2 und IFITM3 inhibiert (s. Abb. 4.18). Dabei zeigte bei den Fusions-Mutanten das Virus HK/68-H17R die geringste Titerreduktion, während das Virus HK/68-H17Y die größte Sensitivität aufwies (s. Abb. 4.18 A). Das Virus HK/68-WT zeigte eine intermediäre Sensitivität.

Bei den rekombinanten Viren mit HAs und NAs repräsentativer IAV weisen die beiden Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1 die größte Sensitivität gegenüber IFITM2 und IFITM3 auf (s. Abb. 4.18 B). Die beiden Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 zeigten hingegen die geringste Titerreduktion.

Dies deutet darauf hin, dass die Sensitivität der IAV gegenüber IFITM2 und IFITM3 beim Viruseintritt abhängig vom Fusions-pH der Viren ist.

4.9.2 Sensitivität gegenüber humanem IFITM2 und IFITM3 nach mehreren Replikationszyklen

Neben der Sensitivität gegenüber IFITM-Proteinen in frühen Replikationsphasen sollte auch die Sensitivität nach mehreren Replikationszyklen untersucht werden (s. 3.5.9). Dafür wurde die Plaquegröße der rekombinanten Viren in IFITM2- und IFITM3-exprimierenden MDCK-Zellen mit der Plaquegröße in parentalen MDCK-Zellen verglichen (s. Abb. 4.19 A).

Die Plaques des Virus HK/68-WT zeigten eine stärkere Größenreduktion in IFITM2- und IFITM3-exprimierenden Zellen als die Plaques des Virus HK/68-H17R (s. Abb. 4.19 B).

Bei den rekombinanten Viren mit HA und NA repräsentativer IAV wiesen die Plaques der Viren Mem-H1N1, mal-H1N1 und HK/68-WT ebenfalls eine stärkere Größenreduktion auf als die Plaques der Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 (s. Abb. 4.19 C).

Aus den beiden Experimenten in IFITM-exprimierenden Zellen (4.9.1 und 4.9.2) lässt sich schließen, dass die Sensitivität der Viren gegenüber IFITM2 und IFITM3 sowohl in der frühen Replikationsphase (4.9.1) als auch nach mehreren Replikationszyklen (4.9.2) abhängig vom Fusions-pH der Viren ist. Viren mit hohem Fusions-pH, wie HK/68-H17R, VN-H5N1 oder Sh-H7N9, sind weniger sensitiv gegenüber der Expression von IFITM-Proteinen als Viren mit einem niedrigen Fusions-pH, wie Mem-H1N1, mal-H1N1 oder HK/68-WT.

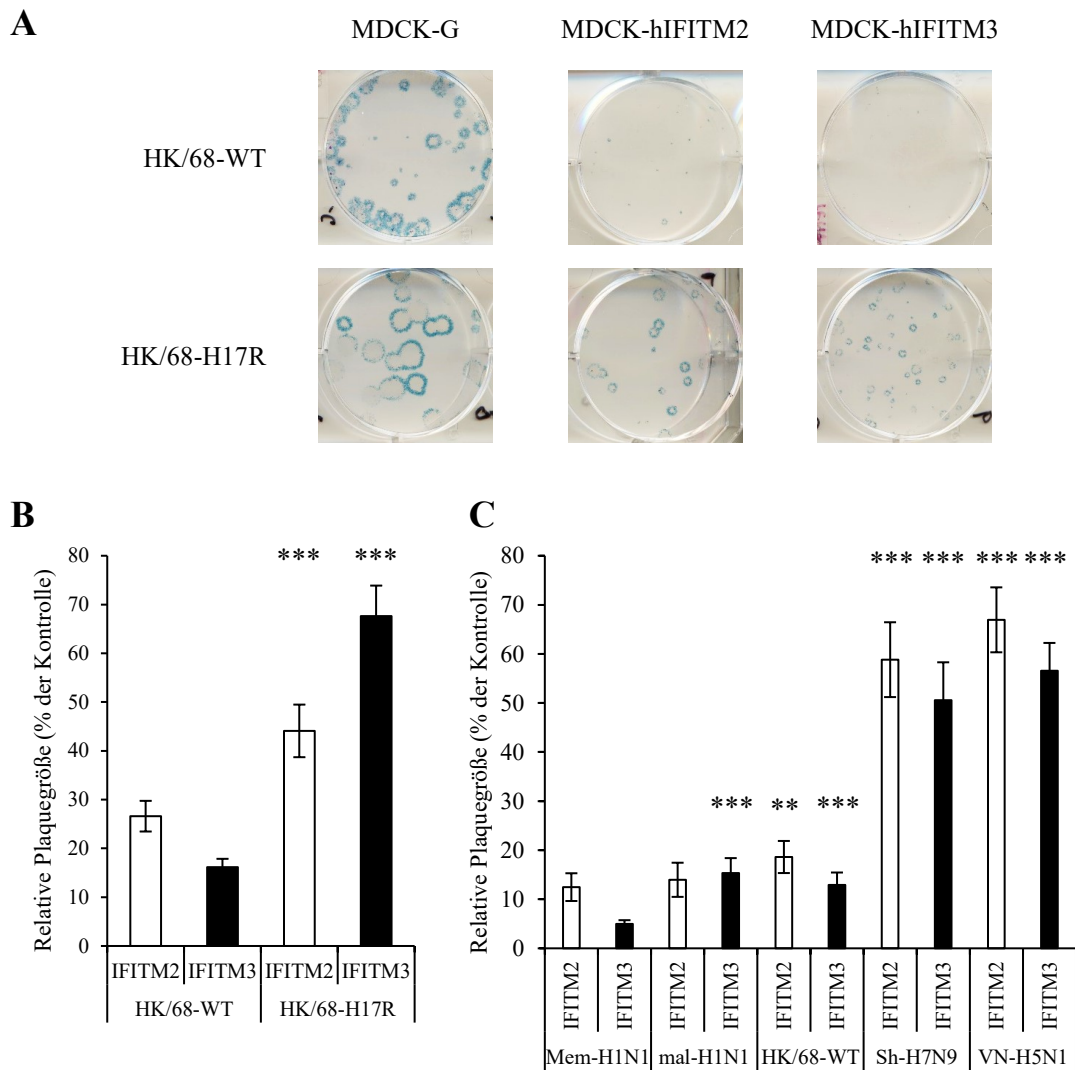


Abbildung 4.19: Veränderung der Plaquegröße nach Infektion von IFITM2- und IFITM3-exprimierenden Zellen. Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Virus in Anwesenheit von Trypsin-TPCK und Overlaymedium infiziert. Infizierte Zellen wurden mittels immunhistochemischer Färbung gegen das virale NP-Protein detektiert und die Plaquegröße in allen Zelllinien ermittelt. Die Plaquegröße von 30-50 Plaques in MDCK-hIFITM2 und MDCK-hIFITM3 wurde in Relation zu der Plaquegröße in MDCK-G Zellen gesetzt. **A) Beispiele für die Reduktion der Plaquegröße in IFITM-exprimierenden Zellen;** **B) Reduktion der Plaquegröße der Fusionsmutanten,** die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's-T-Test* in Bezug auf das Virus HK/68-WT bestimmt ($n \geq 34$) (s. 3.7); **C) Reduktion der Plaquegröße rekombinanter Viren mit HA und NA repräsentativer Viren,** die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's-T-Test* in Bezug auf das Virus Mem-H1N1 bestimmt ($n \geq 39$) (s. 3.7); repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4.10 Multizyklische Replikation in Anwesenheit von IFN- β

Die bisher durchgeführten Experimente zur Sensitivität der Viren gegenüber IFN- β betrachteten hauptsächlich die frühen Phasen der Infektion. Um den Einfluss der kombinierten Effekte der IFN-induzierten Effektormoleküle zu frühen sowie späten Zeitpunkten der Infektion zu betrachten, wurde das Wachstumsverhalten rekombinanter Viren in Calu3-Zellen in Anwesenheit von IFN- β über einen Zeitraum von 72 h beobachtet (s. 3.5.8.3). Dafür wurden Calu3-Zellen mit IFN- β stimuliert. 24 h nach der Stimulation wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert. 1 h nach der Infektion wurde das Inoculum durch Medium ersetzt, welches IFN- β enthielt. Alle 24 h wurden Proben des Überstands entnommen und der Titer der Proben nach einzyklischer Replikation bestimmt.

4.10.1 Replikation von HK/68-WT und HK/68-H17R in Anwesenheit von IFN- β

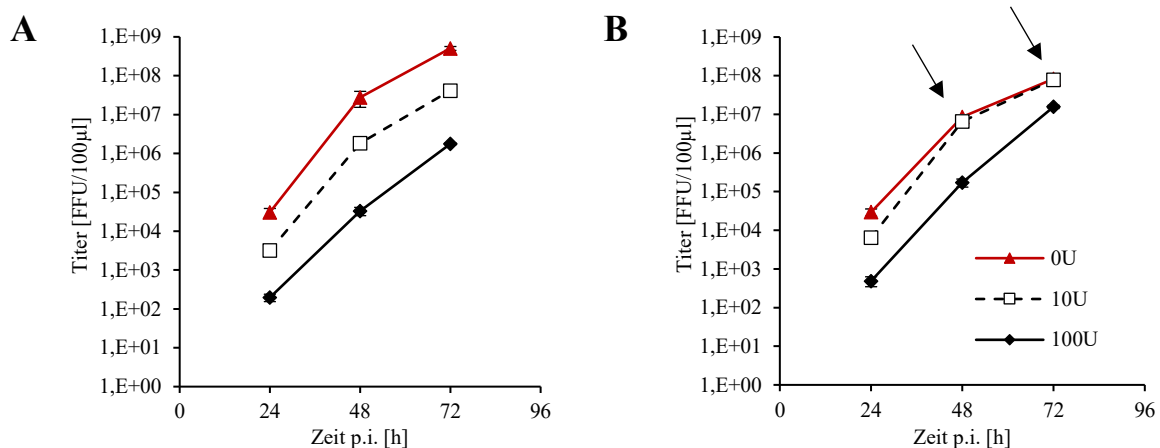


Abbildung 4.20: Replikation von Fusionsmutanten in Calu3-Zellen in Anwesenheit von IFN- β . A) HK/68-WT B) HK/68-H17R; repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten; die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* gegen die Kontrollinfektion (0 U IFN) getestet (s. 3.7). Angegeben sind die Mittelwerte von vier Replikaten sowie ihr Konfidenzintervall. Pfeile markieren Messpunkte, bei denen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollinfektion vorhanden war ($p < 0,05$).

Zunächst wurde der Einfluss von IFN- β auf die Replikation des HK/68-WT Virus und seiner Mutante HK/68-H17R betrachtet. Die Replikation beider Viren wurde in den ersten 24 h durch IFN- β inhibiert. Die Titer des Virus HK/68-WT erreichten in Anwesenheit von IFN- β jedoch zu keiner Zeit die Titer in unstimulierten Zellen (s. Abb. 4.20 A). Dahingegen erreichten die Titer des Virus HK/68-H17R bei Stimulation der Zellen mit 10 U ml⁻¹ IFN nach 48 h die Titer in unstimulierten Zellen (s. Abb. 4.20 B). Auch in Anwesenheit von 100 U ml⁻¹ IFN- β war die Titerreduktion des Virus HK/68-H17R geringer als die Titerreduktion des Virus HK/68-WT.

Der Fusions-pH beeinflusst nicht nur bei der initialen Infektion die Virussensitivität gegenüber IFN-induzierten Effektormolekülen (s. 4.6.4), sondern auch über einen Zeitraum über 72 h.

4.10.2 Replikation rekombinanter Viren mit HA und NA repräsentativer IAV

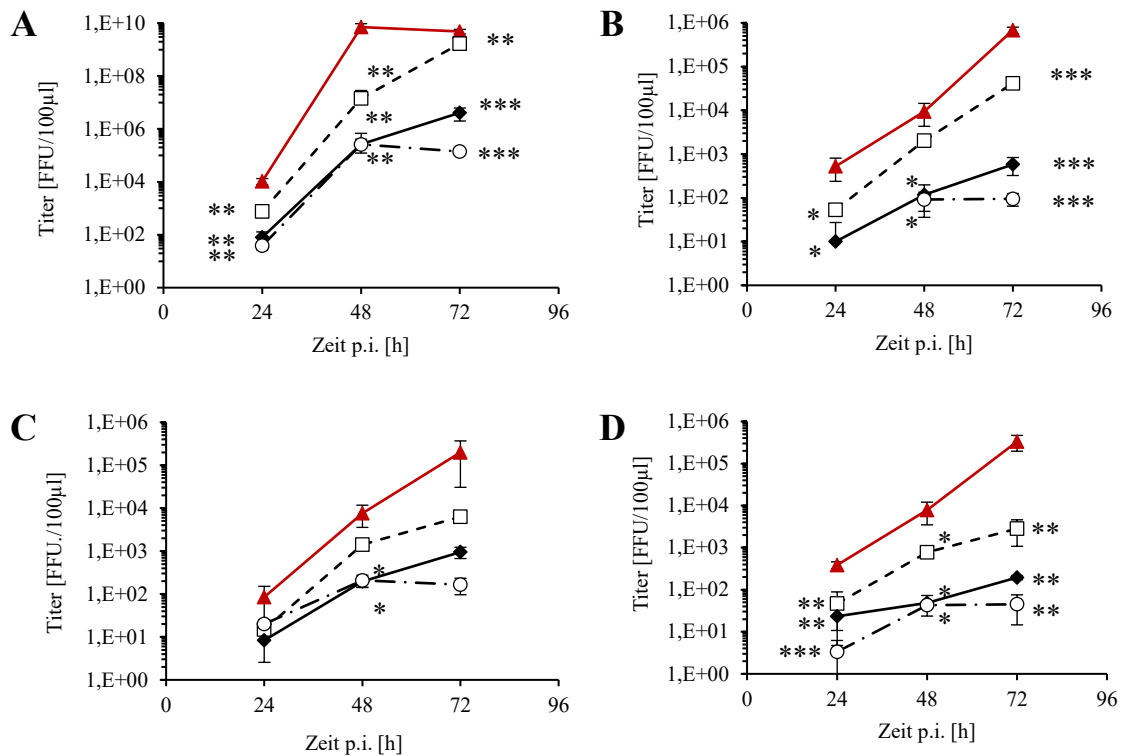


Abbildung 4.21: Replikation rekombinanter Viren in Calu3-Zellen in Anwesenheit von IFN-β. A) VN-H5N1; B) Mem-H1N1; C) Sh-H7N9; D) mal-H1N1; 0 U ml⁻¹ IFN (rot), 10 U ml⁻¹ IFN (weiß gefülltes Quadrat), 100 U ml⁻¹ IFN (schwarz gefülltes Quadrat), 1000 U ml⁻¹ IFN (weiß gefüllter Kreis); repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten; die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's T-Test gegen die Kontrollinfektion (0 U IFN) getestet (s. 3.7). Angegeben sind die Mittelwerte von 4 Replikaten sowie ihr 95%-Konfidenzintervall.

Neben den Mutanten des HK/68-WT Virus sollte auch die Replikation der rekombinanten Viren mit HAs und NAs repräsentativer IAV in Anwesenheit von IFN-β untersucht werden (3.5.8.3).

Das Virus VN-H5N1 zeigte eine geringe Sensitivität gegenüber der IFN-Stimulation (s. Abb. 4.21 A). In Anwesenheit von 10 U ml⁻¹ IFN-β waren die Titer 72 h nach der Infektion vergleichbar mit den Titern in unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten alle anderen Viren eine deutliche 10- bis 20-fache Reduktion (1-2 log-Stufen) der Titer im Vergleich zu den Titern in unstimulierten Zellen 72 h nach der Infektion. Auch bei den anderen IFN-β-Konzentrationen waren die Unterschiede der Titer des Virus VN-H5N1 im Vergleich zu den Titern in unstimulierten Zellen geringer als die der anderen Viren. In diesem Versuch kann man

keine eindeutigen Unterschiede im Replikationsverhalten in Anwesenheit von IFN- β zwischen den Viren Sh-H7N9, Mem-H1N1 und mal-H1N1 feststellen.

Für drei der vier Viren korrelierte die Sensitivität gegenüber IFN- β , während der multizyklischen Replikation mit dem Fusions-pH der Viren. Die einzige Ausnahme stellte das Virus Sh-H7N9 dar, welches sich so verhielt wie die Viren mit niedrigem Fusions-pH, Mem-H1N1 und mal-H1N1. Dennoch zeigt der Vergleich des Virus HK/68-WT mit seiner Fusions-Mutant HK/68-H17R, dass ein höherer Fusions-pH in einer verringerten Sensitivität gegenüber IFN-induzierten Effektormolekülen resultiert.

4.11 Sensitivität wildtypischer Viren gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern die beobachteten Eigenschaften der rekombinanten Viren bezüglich der Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status übertragbar auf die korrespondierenden wildtypischen humanen und zoonotischen Viren sind. Zusätzlich zu dem saisonalen humanen Virus A/Memphis/14/96 (H1N1) wurden die pandemischen Viren A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) und A/Hamburg/5/2009 (H1N1) getestet. Weiterhin wurden die beiden zoonotischen Viren A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1) und A/Anhui/1/2013 (H7N9) getestet.

4.11.1 Inhibition der Infektion durch NH_4Cl

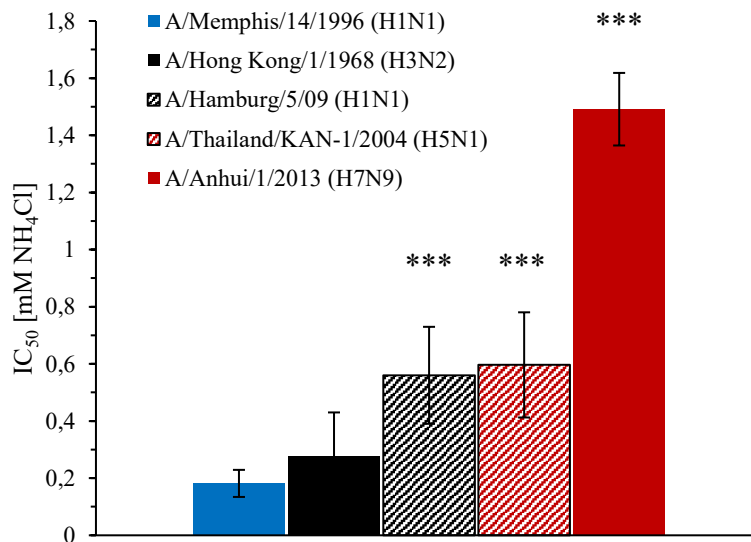


Abbildung 4.22: Inhibition der Virusinfektion durch NH_4Cl . Eine Ammoniumchlorid-Verdünnungsreihe wurde erstellt und die Viren mit dieser Verdünnungsreihe inkubiert. MDCK-Zellen wurden mit dieser Mischung infiziert und 8 h nach der Infektion fixiert. Infizierte Zellen wurden durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP detektiert. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus A/Memphis/14/96 bestimmt (n=6) (s. 3.7).

Um den pH des endosomalen Eintritts der wildtypischen Viren zu untersuchen, wurde die Sensitivität der Viren gegenüber NH_4Cl bestimmt (s. 3.5.2).

Das Virus A/Anhui/1/2013 (H7N9) wies die geringste Sensitivität gegenüber NH_4Cl auf (s. Abb. 4.22). Die beiden Viren A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1) und A/Hamburg/5/2009 (H1N1) wiesen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber NH_4Cl auf, waren jedoch sensitiver als A/Anhui/1/2013 (H7N9). Die Viren A/Memphis/14/1996 (H1N1) und A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) waren am sensitivsten gegenüber NH_4Cl (s. Abb. 4.22). Diese Daten deuten darauf hin,

dass die Viren A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1) und A/Hamburg/5/2009 (H1N1) ein höheres pH-Optimum der Fusion haben als die anderen Viren.

4.11.2 Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status in A549-Zellen

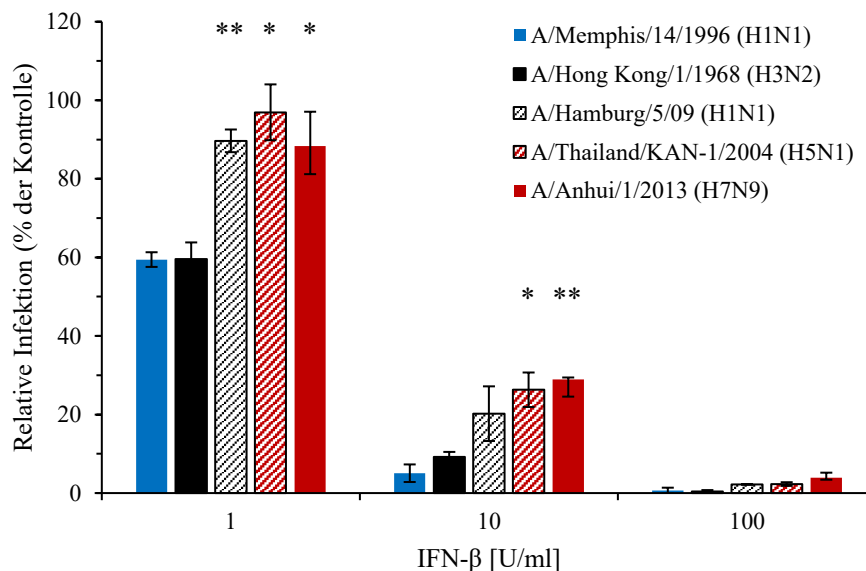


Abbildung 4.23: Inhibition der Infektion nicht-rekombinanter Viren in IFN-vorstimulierten A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen IFN-β inkubiert und anschließend infiziert. 8 h nach der Infektion wurden infizierte Zellen durch eine immunhistochemische Färbung gegen das virale NP detektiert. Mittelwert und Standardabweichung zweier Experimente mit jeweils 3 Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem *Student's T-Test* in Bezug auf das Virus A/Memphis/14/1996 bestimmt (s. 3.7).

Das saisonale Virus A/Memphis/14/1996 (H1N1) und das pandemische Virus A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) zeigten die größte Sensitivität gegenüber einer Stimulation der Zellen mit IFN-β (s. Abb. 4.23). Dagegen wiesen die Viren A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1) und A/Anhui/1/2013 (H7N9) und das pandemische Virus A/Hamburg/5/2009 (H1N1) eine verringerte Sensitivität gegenüber IFN-β auf. Daraus lässt sich schließen, dass unabhängig von wirts- und strangspezifischen Unterschieden der sechs internen Gene der untersuchten Wildtypviren, die Sensitivität dieser Viren gegenüber IFN-β mit dem viralen pH-Optimum der Fusion korreliert.

5 Diskussion

IAV können von anderen Spezies, wie z.B. Schweinen oder domestiziertem Geflügel, auf den Menschen übertragen werden (Garten et al., 2009; Chen et al., 2013; Yuen et al., 1998). Dabei kam es in den letzten 100 Jahren zum Auftreten mehrerer Pandemien, wie z.B. der Spanischen Grippe von 1918 oder der Schweinegrippe von 2009 (Taubenberger und Morens, 2009). Während pandemische Viren im Menschen zirkulieren, treten adaptive Mutationen auf, die meist im HA und den Polymeraseproteinen lokalisiert sind. Die Mutationen im HA sind dabei zumeist HA-stabilisierende Mutationen und Mutationen, die die Rezeptorbindung verändern (zusammengefasst in Herfst et al., 2014). Diese Viren zirkulieren effizient im Menschen.

In besonderen Fokus sind in den letzten Jahren die beiden Virussubtypen H5N1 und H7N9 getreten. Diese Viren wurden vom Geflügel auf den Menschen übertragen und verursachen im Menschen eine schwere Erkrankung einhergehend mit hohen Mortalitätsraten (Chen et al., 2013; Yuen et al., 1998). Diese Viren zirkulieren ineffizient im Menschen und werden gelegentlich durch engen Kontakt zwischen Menschen, z.B. bei der Krankenpflege, übertragen (Taubenberger und Morens, 2009; Qi et al., 2013).

Bei der initialen Infektion des menschlichen Respirationstraktes müssen die Viren verschiedene Barrieren überwinden. Eine dieser Barrieren ist die Mucusschicht, die das Atemwegsepithel bedeckt. Durch die Sekretion sialinsäurehaltiger Proteine kommt es zur Bindung von IAV an den Mucus und die Infektion wird gehemmt (Cohen et al., 2013; Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Auch weitere Inhibitoren kommen im Mucus vor und können die Infektion hemmen (Zanin et al., 2016).

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie verschiedene Proben von nasalem und bronchialem Mucus die Infektion von humanen, aviären und zoonotischen Viren beeinflusst. Da der Fokus dieser Arbeit auf den Funktionen der beiden Glykoproteine lag, wurden in dieser Arbeit rekombinante Viren hergestellt, die das HA und die NA repräsentativer aviärer, zoonotischer und humaner Viren besaßen sowie die internen Gene des Laborstamms A/Puerto Rico/8/1934.

5.1 Replikationsverhalten rekombinanter Viren in verschiedenen Zellsystemen

Zunächst wurde das Replikationsverhalten der rekombinanten Viren in verschiedenen Modellsystemen für die humanen Atemwege untersucht. Dafür wurden zum einen HTBE-Kulturen verwendet, die ein Modellsystem für das tracheo-bronchiale Epithel sind. Des Weiteren wurden HAEC-Kulturen verwendet, welche aus humanen Typ II-Pneumozyten bestehen und ein

Modellsystem für das alveolare Epithel sind. Weiterhin wurden Calu3-Zellen verwendet, die eine permanente Zelllinie aus dem Lungenepithel darstellen.

In Calu3-Zellen replizierte das Virus VN-H5N1 am effizientesten und zu signifikant höheren Titern als die anderen getesteten Viren (s. Abb. 4.1 A). In HTBE-Kulturen replizierten das Virus VN-H5N1 und das Virus mal-H1N1 am effizientesten (s. Abb. 4.1 B). Im Gegensatz dazu replizierten die Viren Sh-H7N9 und Mem-H1N1 deutlich weniger effizient. In humanen Typ II-Pneumozyten replizierten das Virus Mem-H1N1 und VN-H5N1 deutlich effizienter als die Viren mal-H1N1 und Sh-H7N9 (s. Abb. 4.1 C und D).

Die Unterschiede im Replikationsverhalten können verschiedene Ursachen haben. Da die Modellsysteme aus unterschiedlichen Zelltypen bestehen, könnte die Rezeptorspezifität einen signifikanten Einfluss auf die Virusreplikation in den verschiedenen Modellen haben. HTBE-Kulturen bestehen aus zilierten und mucusproduzierenden Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Rezeptorspezifität den Zelltropismus in HTBE-Kulturen beeinflusst. So binden Viren mit aviärer Rezeptorspezifität ausschließlich zilierte Zellen, während Viren mit humaner Rezeptorspezifität alle Zelltypen infizieren (Matrosovich et al., 2004b). Die hier verwendeten rekombinanten Viren weisen ebenfalls Unterschiede in ihrer Rezeptorspezifität auf. So bindet das Virus Mem-H1N1 ausschließlich an $\alpha 2$ -6-verknüpfte Sialinsäuren (s. Tab. 4.1). Rekombinante Viren mit HAs und NAs aviärer und zoonotischer Viren binden hingegen präferentiell den aviären Rezeptortypen, $\alpha 2$ -3-verknüpfte Sialinsäuren (s. Tab. 4.1). Man könnte die Replikationsunterschiede zwischen dem Mem-H1N1 Virus und den aviären Viren durch Unterschiede in der durch die Rezeptorspezifität vermittelten Infektion erklären. Dagegen spricht jedoch, dass die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 trotz vergleichbarer Rezeptorspezifität (Gambaryan et al., 2006; Ramos et al., 2013; Shi et al., 2013) unterschiedlich effizient in allen Modellsystemen replizieren. Auch spricht die vergleichbare Replikationseffizienz der Viren mal-H1N1, Sh-H7N9 und Mem-H1N1 in Calu3-Zellen sowie die vergleichbare Replikationseffizienz von Sh-H7N9 und Mem-H1N1 in HTBE-Kulturen dagegen, da Mem-H1N1 präferentiell an $\alpha 2$ -6-verknüpfte Sialinsäuren und die aviären Viren an $\alpha 2$ -3-verknüpfte Sialinsäuren binden (Gambaryan et al., 2012; Matrosovich et al., 2004b; Matrosovich et al., 2007). Durch die Präferenz für $\alpha 2$ -3-verknüpfte oder $\alpha 2$ -6-verknüpfte Sialinsäuren würde man zudem einen deutlichen Unterschied zwischen der Replikationseffizienz aller aviärer Viren und dem humanen Virus erwarten. Dies ist jedoch in beiden Zellsystemen nicht der Fall, da zum Beispiel in HAEC-Kulturen die Viren Mem-H1N1 und VN-H5N1 gleich effizient replizieren.

Humane saisonale Viren replizieren primär in der Trachea und den Bronchien (Hers, 1966). Es ist interessant zu beobachten, dass das Virus mit humanen Rezeptorbindungseigenschaften, Mem-H1N1, eine deutlich verringerte Replikationseffizienz in HTBE-Kulturen aufweist als die Viren VN-H5N1 und mal-H1N1. Dies widerspricht der allgemeinen Hypothese, dass humane Viren effizient in den oberen Atemwegen replizieren können. Da das Virus Mem-H1N1 die

Glykoproteine eines repräsentativen humanen saisonalen Virus aufweist, kann man davon ausgehen, dass das HA und die NA an die Replikation im Menschen adaptiert sind. Aus diesem Grund sollte eine bessere Replikation im tracheo-bronchialen Epithel zu erwarten sein.

Auch die effiziente Replikation des Virus VN-H5N1 in HTBE-Kulturen widerspricht der allgemeinen Hypothese, dass aviäre Viren nur im alveolaren Epithel effizient replizieren können. Für H5N1-Viren konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sie zilierte Zellen des tracheo-bronchialen Epithels infizieren können (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2006), was auch ein Hinweis darauf ist, dass VN-H5N1 effizient in HTBE-Kulturen replizieren kann. Aufgrund der hohen Diversität der HTBE-Kulturen variiert die Zusammensetzung der HTBE-Kulturen. Dadurch kann es vorkommen, dass die Replikationsbedingungen, z.B. die Anzahl der Rezeptoren, für humane Viren in diesem Fall ungünstig waren. Auf der anderen Seite kann auch eine Inkompatibilität des HAs und der NA von A/Memphis/14/1996 mit den internen Genen des Virus A/Puerto Rico/8/1934 für die ineffiziente Replikation verantwortlich sein. Dass die Replikation abhängig vom Zusammenwirken der internen Gene mit den Glyoproteinen sein kann, konnte unter anderem von Johnson et al. gezeigt werden (Johnson et al., 2015).

Auch die effiziente Replikation des Virus Mem-H1N1 in HAEC-Kulturen widerspricht der Hypothese, dass humane Viren nicht im alveolaren Epithel replizieren. Die Replikationseffizienz dieses Virus ist somit umgekehrt zu der vorher erwarteten Replikationseffizienz. Auch die effiziente Replikation des Virus VN-H5N1 in beiden primären Zellsystemen war nicht erwartet worden.

Es wurde von mehreren Gruppen gezeigt, dass neben der Rezeptorbindung auch die Stabilität, bzw. das pH-Optimum der Fusion, einen Einfluss auf die Replikationseffizienz haben kann. So unterschied sich die Replikationseffizienz von Fusionsmutanten des H5N1-Subtyps in A549-Zellen. Viren mit einem niedrigem Fusions-pH replizierten weniger effizient als Viren mit hohem Fusions-pH (Zaraket, Bridges und Russell, 2013). In MDCK-Zellen wiederum konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Fusions-pH zu einer verminderten Replikationseffizienz führte (Reed et al., 2010). Daten aus Tierexperimenten in Hühnern und Mäusen zeigten, dass Viren mit einem hohen Fusions-pH effizienter replizieren können (Zaraket et al., 2013; Reed et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HTBE- und HAEC-Kulturen sind primäre humane Zellen und modellieren das ausdifferenzierte bronchio-tracheale Epithel und das Alveoli-Epithel. Diese primären Zellen haben andere Eigenschaften als immortalisierte Zellen oder Zellen, die aus Krebsbiopsien gewonnen wurden. Die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 besitzen ein vergleichbares hohes pH-Optimum der Fusion (s. Tab. 4.2). Dennoch repliziert das Virus VN-H5N1 deutlich effizienter in beiden Modellsystemen als das Virus Sh-H7N9 (s. Abb. 4.1). Ähnliches gilt für die Viren Mem-H1N1 und mal-H1N1, welche ebenfalls ein vergleichbares pH-Optimum besitzen (s. Tab. 4.2). In diesem Fall repliziert das Virus Mem-H1N1 effizienter in HAEC-Kulturen als das Virus mal-H1N1, was gegen die allgemeine Theorie spricht, dass humane Viren nicht effizient

in der Lunge replizieren können. In HTBE-Kulturen ist es genau umgekehrt. Würden ausschließlich die Fusions-Eigenschaften der Viren die Replikationseffizienz beeinflussen, so müsste die Replikation von VN-H5N1 und von Sh-H7N9 gleich effizient sein. Dies gilt auch für die Replikation von mal-H1N1 und Mem-H1N1. Somit scheinen Unterschiede im Fusions-pH als Ursache für die unterschiedlichen Replikationseffizienzen auszuschneiden.

Alle rekombinanten Viren waren in der Lage in allen Zelltypen zu replizieren (s. Abb. 4.1). Dabei zeigte das Virus VN-H5N1 in allen drei getesteten Zellsystemen die größte Replikationseffizienz. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die hohe Pathogenität dieses Virus im Menschen zumindest teilweise durch die Glykoproteine vermittelt wird, da es alle Teile des Respirationstrakts, das tracheo-bronchiale Epithel (HTBE) und das Lungenepithel (HAEC), effizient infiziert. Hingegen zeigte das Virus Sh-H7N9, welches im Menschen ebenfalls eine hohe Pathogenität aufweist, in keinem der Modellsysteme eine effiziente Replikation. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Replikationseffizienz dieses Virus durch HA- und NA-unabhängige Faktoren, wie zum Beispiel eine erhöhte Polymeraseaktivität, vermittelt werden könnte.

5.2 Einfluss der humanen Mucusbarriere auf die Infektion von IAV

Die Atemwege sezernieren eine Mucusschicht, die Pathogene wie z. B. IAV einfangen und dadurch die Infektion der Atemwege verhindern soll. Ein Teil dieser Arbeit behandelt die Interaktion von IAV mit humanem Mucus näher zu untersuchen. Dafür wurde die Inhibition der Infektion durch bronchialen Mucus aus HTBE-Kulturen untersucht (s. 4.3). In MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass aviäre (mal-H1N1) und zoonotische (VN-H5N1) Viren weniger sensitiv gegenüber bronchialen Mucus waren als humane Viren (Mem-H1N1) (s. 4.3.1).

Es ist anzumerken, dass MDCK-Zellen aus der Niere eines Hundes stammen und somit nicht den primären Replikationsort im Menschen modellieren. Als Nächstes wollten wir untersuchen ob auch in humanen Zellen humane Viren sensitiver gegenüber bronchialen Mucus sind als aviäre Viren. Dazu wurden Calu3-Zellen verwendet, welche humane Lungenzellen sind. Auch in Calu3-Zellen war das Virus Mem-H1N1 sensitiver gegenüber Mucus als das Virus mal-H1N1 (s. Abb. 4.). Die Inhibition des Virus Mem-H1N1 ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in MDCK-Zellen. Des Weiteren wurde die Inhibition in HTBE-Kulturen bestimmt, welche das Epithel des primären Infektionsortes von IAV modellieren. In HTBE-Kulturen gab es keine Unterschiede in der Inhibition zwischen aviärem und humanem Viren (s. Abb. 4.7).

Der allgemeine Konsens besagt, dass aviäre Viren sensitiver gegenüber bronchialem Mucus sind und den Menschen daher nur schlecht infizieren können (Nicholls, 2013; Limsuwat et al., 2013; Scharfman, Lamblin und Roussel, 1995). Dies geht auf die Arbeit von Couceiro et al. zurück

(Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Couceiro et al. zeigten, dass bronchialer Mucus hauptsächlich Proteine mit α 2-3-verknüpften Sialinsäuren enthält. Weiterhin banden aviäre Viren an mucusproduzierende Zellen wohingegen humane Viren an die apikale Seite von Epithelzellen banden. Daraus entstand die Vermutung, dass aviäre Viren Mucus stärker als humane Viren binden und dementsprechend stärker gehemmt werden. Couceiro et al. stellten die Hypothese auf, dass die Rezeptorbindung von IAV von mindestens zwei selektiven Drücken beeinflusst wird: 1. dem Druck eine effiziente Bindung ans Epithel zu besitzen und 2. dem Druck nicht an den Mucus zu binden. (Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Diskrepanz zwischen den generierten Daten und der vorherrschenden Meinung näher zu untersuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Arbeiten bezüglich der Mucus-vermittelten IAV-Inhibition widersprechen dem allgemeinen Konsens (Limsuwat et al., 2013; Roberts et al., 2011). Die Inhibition durch Mucus basiert auf der kompetitiven Hemmung der Rezeptorbindung mittels löslicher Rezeptoranaloga. Somit kann die Inhibition durch Mucus abhängig von den Glykoproteinfunktionen, Rezeptorbindung seitens des HAs und Sialidase-Aktivität der NA sein (Zanin et al., 2016; Nicholls, 2013). Die Kombination aus einem stark bindenden HA mit einer schwachen NA würde zu einer starken Hemmung durch Rezeptoranaloga führen. Bei einem schwach bindenden HA mit einer starken NA käme es zu einer zu schnellen Abspaltung der Rezeptoren auf der Zelle, wodurch die Viren die Zelle nicht infizieren könnten. Die HA/NA-Balance kann einen signifikanten Einfluss auf die Inhibition von IAV durch Mucus haben (s. 1.5). Viren mit niedriger NA-Aktivität werden stärker durch Mucus gehemmt, als Viren mit hoher NA-Aktivität bei gleichbleibender Rezeptorbindung seitens des HAs (Zanin et al., 2015; Yang et al., 2014).

Die Inhibition durch Mucus kann auch abhängig von im Mucus vorhandenen Inhibitoren und der Rezeptorverteilung auf der Zielzelle sein. Die Sialinsäuren in den Mucusproben aus dieser Arbeit wurden mittels spezifischer Lektine nachgewiesen (s. Abb. 4.4). Es konnten die Rezeptoren Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc und Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, humane und aviäre Rezeptoren, detektiert werden. Andere Gruppen konnten ebenfalls diese Sialinsäuren in Mucusproben nachweisen (Lamblin und Roussel, 1993; Thornton, Rousseau und McGuckin, 2008). Somit haben die verwendeten Mucusproben die Kapazität Viren mit aviärer sowie humaner Rezeptorspezifität zu inhibieren.

Es wurden für diese Arbeit Mucusproben von verschiedenen HTBE-Kulturen gesammelt. Zusätzlich dazu wurden in dieser Arbeit Mucusproben von HNE-Kulturen und der nasale Mucus eines Freiwilligen untersucht. Die einzelnen Proben wiesen unterschiedliche Inhibitionseffizienzen auf, was auf Unterschiede in der Zusammensetzung des Mucus zurückschließen lässt (Daten nicht gezeigt). Krankheiten können die Sialinsäureverteilung im Mucus beeinflussen. Es wurde nachgewiesen, dass der Mucus von Patienten mit zystischer Fibrose einen höheren Anteil von α 2-3-verknüpften Sialinsäuren aufweist als der Mucus von

gesunden Probanden (Shori et al., 2001; Lo-Guidice et al., 1997). Früher konnten nur Mucusproben von Patienten mit zystischer Fibrose genutzt werden, wie das auch bei den Mucusproben in den Arbeiten von Couceiro et al. der Fall war (Couceiro, Paulson und Baum, 1993). Dies könnte erklären, warum aviäre Viren an den Mucus in den Becherzellen gebunden haben und humane Viren hingegen nur an der Zelloberfläche banden.

Auch die Bindungsstärke der Viren an die Zelle könnte ein wichtiger Faktor sein, der die Inhibition beeinflusst. Eine stärkere Bindung an die Zelle könnte die inhibitorische Wirkung des Mucus verringern. Um die Bindungsstärke der Viren an die Zellen abzuschätzen, wurde die Infektion verschiedener Viren in NA-vorbehandelten Zellen untersucht (4.3.2). Das Virus mal-H1N1 zeigte eine geringere Sensitivität gegenüber der Desialylierung der Zellen als das Virus Mem-H1N1 (s. Abb. 4.3). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das mal-H1N1 eine höhere Bindungsaffinität an die MDCK-Zellen hat als das Mem-H1N1 Virus. Dies könnte den geringen Effekt von bronchialen Mucus auf die Infektion des mal-H1N1 Virus erklären. Eine verstärkte Bindung an den zellulären Rezeptor durch das Virus mal-H1N1 deutet auch darauf hin, dass es stärker an aviäre Rezeptoren im Mucus bindet. Da MDCK-Zellen jedoch eine große Menge an aviären Rezeptoren aufweisen (Matrosovich et al., 2003), ist es wahrscheinlich, dass durch die hohe Anzahl aviärer Rezeptoren die Inhibition abgeschwächt wird.

Die NA spaltet lösliche Sialinsäuren von Köderrezeptoren im Mucus ab. Damit stellt die NA-Aktivität, welche zwischen Virusisolaten variieren kann (Cohen et al., 2013; Wagner et al., 2000), einen entscheidenden Faktor der Hemmung durch Mucus dar. Um zu überprüfen, ob eine verringerte NA-Aktivität des Mem-H1N1 Virus für die erhöhte Sensitivität gegenüber Mucus verantwortlich ist, wurde die Neutralisation in Anwesenheit des NA-Inhibitors Oseltamivir durchgeführt (s. Abb.4.5). Trotz der Inhibition der NA-Aktivität war das Virus Mem-H1N1 sensitiver gegenüber Mucus als die beiden getesteten aviären Viren VN-H5N1 und mal-H1N1. Dies deutet darauf hin, dass die NA-Aktivität als Ursache für die Unterschiede der mucusvermittelten Inhibition in diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden kann und dass die Inhibition primär auf der Wechselwirkung des HAs mit Mucus beruht. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die NA-Aktivität ein wichtiger Faktor bei der Infektion in Anwesenheit von bronchialen Mucus für aviäre und humane Viren ist.

Im Gegensatz zu humanen Viren haben NAs aus aviären Viren eine zweite sialinsäurebindende Domäne, die HAD (s. 1.5). Es wird vermutet, dass die HAD die Spaltung von langkettigen sialinsäurehaltigen Proteinen erleichtert. Ob die HAD vorteilhaft bei der Inhibition durch humanen bronchialen Mucus ist, muss noch untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass humane Viren keine HAD aufweisen (Uhlendorff et al., 2009; Kobasa et al., 1997), kann man jedoch davon ausgehen, dass dies nicht der Fall ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass vor allem die Rezeptorbindungseigenschaften der Viren entscheidend für die mucusvermittelte Inhibition sind. Die Ergebnisse

deuten auch darauf hin, dass die Wahl der Zelllinie die Inhibition der Infektion durch bronchialen Mucus signifikant beeinflussen kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in MDCK-Zellen das Virus Mem-H1N1 deutlich sensibler gegenüber bronchialen Mucus war als die beiden aviären Viren mal-H1N1 und VN-H5N1 (s. Abb. 4.2). Dies stimmt mit vorherigen Beobachtungen anderer Gruppen überein, die demonstrierten, dass humane Viren deutlich sensibler gegenüber Mucus waren als aviäre (Limsuwat et al., 2013; Roberts et al., 2011). MDCK-Zellen exprimieren auf der Oberfläche mehr α 2-3-verknüpfte als α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren (Matrosovich et al., 2003). Aviäre Viren würden dadurch weniger stark gehemmt als humane Viren, da die kompetitive Hemmung aviärer Viren durch die hohe Anzahl aviärer Rezeptoren auf den Zellen reduziert wird. Humane Viren würden hingegen stärker gehemmt werden, da weniger humane Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind. MDCK-SIAT-Zellen exprimieren die 2,6-Sialyltransferase, welche die Anzahl humaner Rezeptoren durch die Transformation von α 2-3-verknüpften Sialinsäuren in α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche der MDCK-Zellen erhöht (Matrosovich et al., 2003). Bei Erhöhung der humanen Rezeptoren auf der Zelloberfläche zeigten sich signifikante Unterschiede zur Inhibition in MDCK-Zellen. Das humane Virus war weniger sensibel in MDCK-SIAT- als in MDCK-Zellen (s. Abb. 4.6). Dieser Versuch zeigt, dass eine Erhöhung der Rezeptoren die inhibitorische Wirkung von Mucus verringert. Daraus lässt sich schließen, dass die Wahl der Zelllinie einen signifikanten Einfluss auf die Inhibition der IAV-Infektion durch Mucus haben kann. In Calu3-Zellen, einer humanen Zelllinie aus der Lunge, zeigt sich ebenfalls eine verringerte Inhibition des humanen Virus im Vergleich zur Inhibition in MDCK-Zellen. In HTBE-Kulturen, dem Modellsystem für das tracheo-bronchiale Epithel des Menschen, wiederum zeigten sich keine Unterschiede in der Inhibition durch Mucus zwischen humanen und aviären Viren (s. Abb. 4.8). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in der Trachea und den Bronchien humane und aviäre Viren im gleichen Ausmaß gehemmt werden. Diese Erkenntnis widerspricht der vorherrschenden Meinung, dass nur aviäre Viren durch Mucus gehemmt werden. Dies bedeutet wiederum, dass die standardmäßig genutzten Zellkultursysteme kein adäquates Mittel darstellen, um die Inhibition durch Mucus zu untersuchen. Die Inhibition kann auch abhängig von der Beschaffenheit der Zelloberfläche oder von der Anzahl der Rezeptoren auf den Zellen sein. Die entstandene Diskrepanz zwischen dem Konsens bezüglich der Mucosinhibition und den in Zellkultur auftretenden Ergebnissen kann durch die Wahl der Zelllinie sowie durch die Wahl der Mucusprobe erklärt werden. Der inhibitorische Effekt von Mucus auf die Infektion aviärer Viren wurde durch die Wahl von MDCK-Zellen verringert (Limsuwat et al., 2013; Roberts et al., 2011). Auf der anderen Seite kann durch die Mucusprobe von Patienten mit zystischer Fibrose, die erhöhte Mengen aviärer Rezeptoren enthalten (Shori et al., 2001; Lo-Guidice et al., 1997), die Inhibition aviärer Viren verstärkt werden.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde die Bindung der Viren an unterschiedliche Mucusproben im Fetuin-Bindungs-Inhibitionsassay untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass die Bindung aviärer und humaner Viren an HRP-gekoppelten Fetuinen durch humanen Mucus gehemmt wird. Die deutliche Bindung des Virus mal-H1N1 an den Mucus deutet darauf hin, dass die Inhibition der Infektion in Zellen abhängig von der Bindung der Viren an die Zellen ist.

Nasaler Mucus hemmte die Fetuinbindung weniger stark als die bronchialen Proben. Vermutlich ist eine geringere Proteinmenge in dieser Mucusprobe dafür verantwortlich. Während die bronchialen Proben von den HTBE-Kulturen gesammelt werden, welche große Mengen an Mucus produzieren, stammt der nasale Mucus von Probanden. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass der HTBE-Mucus einen höheren Proteinanteil aufweist, was die unterschiedliche Intensität der Hemmung erklären könnte.

Somit zeigt die Hemmung der Rezeptorbindung sowie die Infektionsinhibition durch Mucus in HTBE-Kulturen, dass sowohl aviäre als auch humane Viren an nasalen und bronchialen Mucus binden und durch ihn inhibiert werden können, woraus eine verringerte Infektionsrate resultiert. Die Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass aviäre und humane IAV durch Mucus bei der Infektion im humanen Respirationstrakt, wie er in HTBE-Kulturen modelliert wird, gleich stark inhibiert werden.

5.3 Charakterisierung des Mucus

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Mucusproben aus HTBE-Kulturen eine inhibitorische Wirkung gegenüber IAV aufweisen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es den Mucus näher zu charakterisieren und potentielle Inhibitoren zu identifizieren.

Zum einen sollten die Sialinsäuren im Mucus detektiert werden. Dass sowohl aviäre als auch humane Rezeptoren in humanem bronchialem Mucus aus HTBE-Kulturen enthalten sind, wurde bereits gezeigt (s. Abb. 4.4) (Shori et al., 2001; Nicholls et al., 2007). Somit sollte der Mucus in der Lage sein aviäre und humane IAV zu inhibieren.

Mucus kann verschiedene Arten von Inhibitoren enthalten. So könnten hitzesensitive β -Inhibitoren, wie z. B. Collektine, oder hitzestabile γ -Inhibitoren, sialinsäurehaltige Proteine, in den Mucusproben vorkommen (zusammengefasst in Anders et al., 1994). Deswegen wurde bronchialer Mucus auf unterschiedliche Weise vorbehandelt und im Fetuinbindungsinhibitionsassay auf seine inhibitorische Wirkung untersucht. Um potentielle β -Inhibitoren zu inaktivieren, wurde der Mucus bei 62°C inkubiert. Diese Behandlung hatte keinen Effekt auf die inhibitorische Wirkung des Mucus (s. Abb. 4.10). Dies könnte bedeuten, dass im Mucus enthaltene β -Inhibitoren keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung der getesteten Viren haben. Andererseits gibt es keinen Nachweis von β -Inhibitoren in den verwendeten Mucusproben.

Die NA von *V. cholerae* spaltet terminale Sialinsäuren ab. Mit Hilfe der NA kann man überprüfen ob ausschließlich sialylierte Proteine die Bindung von IAV inhibieren oder ob auch andere Mucuskomponenten eine inhibitorische Wirkung haben. Desialylierte Proteine können nicht an IAV binden, was in einer verringerten Inhibition resultieren sollte. Um den Einfluss sialinsäurehaltiger Proteine auf die Inhibition zu untersuchen, wurde der Mucus mit der NA von *V. cholerae* inkubiert. Durch die NA-Behandlung des Mucus ist die inhibitorische Wirkung teilweise bzw. komplett aufgehoben (s. Abb. 4.10). Auch in Zellkultur konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Damit ist sowohl die beobachtete Reduktion der Rezeptorbindung als auch die Infektionsinhibition durch Mucus auf lösliche Sialinsäuren in den getesteten Mucusproben zurückzuführen. Diese Daten zeigen, dass die Infektionsinhibition durch Mucus zum größten Teil durch lösliche, sialinsäurehaltige Komponenten mittels kompetitiver Hemmung verursacht wird.

Um zu untersuchen ob aviäre und humane Rezeptoren auf unterschiedlichen Komponenten im Mucus auftreten wurde der Mucus durch Differentialzentrifugation fraktioniert. Dafür wurden sowohl bronchiale als auch nasale Mucusproben verschiedener Donoren verwendet. Die Fraktion LZ-Pellet ist das Pellet nach Zentrifugation des Mucus bei niedriger Umdrehungszahl. Es enthält große Mucuskomponenten, wie z.B. Zellreste. Diese Fraktion wies keinen inhibitorischen Effekt auf. Lösliche Inhibitoren würden bei der Differentialzentrifugation im Überstand nach Ultrazentrifugation vorkommen (UZ-Überstand). Das Pellet der Ultrazentrifugation (UZ-Pellet) kann Komponenten, wie z.B. Exosomen und auf ihnen gebundene Proteine, beinhalten. Die inhibitorische Wirkung dieser Fraktionen wurde im Fetuin-Bindungs-Inhibitionsassay getestet.

So zeigte der bronchiale Mucus HTBE-3 ausschließlich im UZ-Überstand eine inhibitorische Wirkung. Dahingegen konnte beim Mucus HTBE-4 auch das UZ-Pellet die Bindung an Fetuine leicht inhibieren (s. Abb. 4.11). Dies weist darauf hin, dass die Inhibition abhängig vom Donor sein kann. Beim nasalen Mucus (nasaler Mucus und HNE-Mucus, s. Abb. 4.11) ist der Unterschied nicht so stark ausgeprägt. Dennoch ist dies ein Hinweis darauf, dass die Verteilung von Inhibitoren im Mucus abhängig vom Donor der HTBE-Kulturen und vom Tag der Mucusisolation variieren kann.

Die Verteilung von Inhibitoren aviärer und humaner Viren variiert je nach Herkunft der Mucusprobe (s. Abb. 4.11), der ist bei den bronchialen Mucusproben jedoch vergleichbar. So wurde der Großteil der Inhibition der Proben HTBE-3 und HTBE-4 durch den UZ-Überstand vermittelt. Bei den nasalen Mucusproben war dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt. Die Inhibition des humanen Virus wird hauptsächlich durch das UZ-Pellet vermittelt, während bei den aviären Viren die Inhibitoren in beiden Fraktionen zu vergleichbaren Mengen vorkommen (s. Abb. 4.11). Dies deutet darauf hin, dass im nasalen Mucus die Inhibitoren humaner Viren vermehrt auf nicht-löslichen Komponenten, wie z.B. Exosomen oder Zellreste, vorkommen. Dass Exosomen in der Lage sind die Infektion von IAV zu inhibieren und in den apikalen Sekreten von

HTBE-Kulturen vorkommen, wurde bereits nachgewiesen (Kesimer et al., 2009). Durch die Ultrazentrifugation können Exosomen im UZ-Pellet vorhanden sein, die α 2-6 verknüpfte Sialinsäuren aufweisen. Kesimer et al. untersuchten die Inhibition jedoch nur anhand eines humanen Virus. Die Inhibition aviärer Viren durch Exosomen ist nicht näher untersucht (Kesimer et al., 2009). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass auch aviäre Viren durch die exosomenenthaltende Fraktion inhibiert werden können. Entweder haben die Exosomen neben α 2-6-verknüpften Sialinsäuren auch noch α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren, oder es sind im UZ-Pellet noch andere α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren tragende Komponenten enthalten. Es wäre auch möglich, dass bei der Abnahme des UZ-Überstands Reste des Überstands beim Pellet blieben. Für andere mögliche Komponenten, für die gezeigt wurde, dass sie in der Exosomenfraktion auftreten können, wie z.B. MUC4 und MUC16, konnte bisher nicht gezeigt werden, dass sie an IAV binden und somit die Infektion inhibieren (Kesimer et al., 2009).

Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde nicht näher untersucht. Lösliche inhibitorische Komponenten im UZ-Überstand könnten Muzine, wie z.B. Muc5B, oder andere sialinsäurehaltige Proteine sein. Für diese Proteine wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind IAV zu binden und die Infektion zu inhibieren (Hillaire et al., 2014; Ehre et al., 2012).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von mehreren Faktoren abhängig ist. Herkunft und Donor spielen eine entscheidende Rolle für die Inhibitionskapazität von Mucus. Dabei können die Inhibitoren aviärer und humaner Viren auch in unterschiedlichen Fraktionen, bzw. auf unterschiedlichen Komponenten auftreten.

5.4 Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status

IAV der Subtypen H5N1 und H7N9 verursachen im Menschen respiratorische Erkrankungen, die mit einer hohen Pathogenität einhergehen. Dabei zeichnen sie sich durch eine hohe Mortalität beim Menschen aus. So weisen Viren der Subtypen H5N1 und H7N9 Mortalitätsraten von 30 bis 80 % auf (WHO, 2016a). Die genauen Ursachen für die hohe Pathogenität dieser Viren sind Gegenstand aktueller Forschungen. Dabei wurden bisher vor allem die Rezeptorspezifität dieser Viren und die Spaltung des HAs als wichtige Pathogenitätsfaktoren angesehen. Das HA von HPAI-Viren des Subtyps H5N1 besitzt eine multibasische Spaltstelle, die eine systemische Ausbreitung des Virus bei Vögeln ermöglicht (Stieneke-Gröber et al., 1992; Yuen et al., 1998). Jedoch zeigte das Auftreten des H7N9-Virus von 2013 mit einer monobasischen Spaltstelle, dass eine multibasische Spaltstelle nicht notwendig für eine hohe Pathogenität beim Menschen ist (Gao et al., 2013). IAV aus domestiziertem Geflügel, wie Viren der Subtypen H5N1 und H7NX, präferieren sulfatierte NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc als Rezeptor (Gambaryan et al., 2008; Gambaryan et al., 2012). Das H7N9-Virus von 2013 kann zusätzlich den humanen Rezeptortypen

binden (Xiong et al., 2013). Es wird vermutet, dass diese Präferenz für sulfatierte Rezeptoren ebenfalls ein Pathogenitätsfaktor darstellt da dadurch bestimmte Gewebetypen, wie zum Beispiel das Endothel, infiziert werden können (Ocaña-Macchi et al., 2009). Für HPAI H5N1-Viren wurde beschrieben, dass sie einen Zytokinsturm auslösen, welcher ebenfalls zur Pathogenität dieser Viren beitragen soll (de Jong et al., 2006; Cheng et al., 2010). Das Typ I- und Typ III-Interferon-System dient der Abwehr viraler Infektionen. Durch die Aktivierung von Interferon-stimulierten Genen wird ein antiviraler Status in den Zellen aufgebaut. Die Genprodukte dienen zum einen der Detektion und zum anderen der Inhibition der Virusreplikation. Eine effiziente Replikation der Viren ist dabei besonders abhängig davon diese Immunantwort zu umgehen. Dabei geht man davon aus, dass eine effizientere Vermeidung der Immunantwort mit einer höheren Pathogenität einhergeht. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des HAs und der NA auf die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status zu untersuchen.

Um dies zu untersuchen wurden rekombinante Viren hergestellt, die das HA und die NA repräsentativer aviärer, zoonotischer und humaner Viren besaßen sowie die internen Gene des Laborstammes A/Puerto Rico/8/1934.

5.4.1 Fusions-pH abhängige Sensitivität der Infektion während des Zelleintritts

Die rekombinanten Viren enthielten das HA und die NA repräsentativer aviärer, zoonotischer und humaner Viren, inklusive zweier Vertreter der pathogenen H5N1- und H7N9-Subtypen. Die Eigenschaften des HAs können sich abhängig von der Spezies oder auch des Subtyps unterscheiden. In dieser Arbeit wurden Viren untersucht, die sich in ihrer Rezeptorspezifität, dem Fusions-pH und ihrer NA-Aktivität unterscheiden. Bei der Infektion von IFN- β vorbehandelten A549- bzw. Calu3-Zellen zeigten die beiden Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 eine deutlich effizientere Infektion als die anderen getesteten Viren (s. Abb. 4.12). Dieser Versuch zeigt, dass das HA und/ oder die NA einen signifikanten Einfluss auf die Infektion von IFN-vorstimulierten Zellen haben kann. Interessanterweise zeigten die rekombinanten Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 mit den Glykoproteinen hochpathogener zoonotischer Viren die geringste Sensitivität gegenüber der IFN-Stimulation.

Die Sensitivität der Viren gegenüber dem IFN-induzierten Status korrelierte dabei interessanterweise mit dem Fusions-pH (s. Tab. 4.2). Die Viren mit hohem Fusions-pH, VN-H5N1 und Sh-H7N9, infizierten IFN-vorbehandelte Zellen effizienter als die Viren mit niedrigem Fusions-pH, Mem-H1N1, mal-H1N1 und mal-H2N2. Aus diesen Ergebnissen ergab sich zunächst die Hypothese, dass der Fusions-pH die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status signifikant beeinflussen kann.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Fusionsmutanten des Virus A/Hong Kong/1/1968 hergestellt (s. Tab. 4.3). Die Fusions-eigenschaften der Mutanten wurden analysiert und deckten sich mit bereits publizierten Ergebnissen (Daniels et al., 1985; Lin et al., 1997; Rott et al., 1984; Thoennes et al., 2008). Das Virus HK/68-H17R wies den höchsten Fusions-pH auf, wohingegen das Virus HK/68-H17Y den niedrigsten Fusions-pH aufwies. Auch bei den Fusions-Mutanten zeigte das Virus mit dem höchsten Fusions-pH, HK/68-H17R, die effizienteste Infektion nach IFN-Vorstimulation der Zellen. Die Viren mit dem niedrigsten Fusions-pH hingegen, HK/68-WT und HK/68-H17Y, zeigten die größte Sensitivität gegenüber einer IFN-Vorbehandlung der Zellen (s. Abb. 4.13). Damit bestätigte sich, dass der Fusions-pH einen signifikanten Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status hat.

Die Signifikanz der Beobachtung, dass das pH-Optimum der Fusion die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten Status beeinflusst, wurde zusätzlich durch Experimente in mit IFN- β stimulierten primären HAEC-Kulturen und HTBE-Kulturen unterstützt. Auch in HAEC-Kulturen waren die Viren HK/68-H17R, VN-H5N1 und Sh-H7N9 signifikant weniger sensitiv gegenüber der IFN-Behandlung als das Virus HK/68-WT (s. Abb. 4.14 A). Dies weist darauf hin, dass in primären Typ II Pneumozyten die Sensitivität von IAV gegenüber IFN-induzierten Effektormolekülen ebenfalls abhängig vom Fusions-pH ist. In HTBE-Kulturen zeigte das Virus HK/68-H17R in drei Experimenten ebenfalls eine geringere Sensitivität als HK/68-WT, was auch darauf hindeutet, dass im Epithel des Respirationstraktes der Fusions-pH die Sensitivität gegenüber IFN beeinflusst. Die Daten für die Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 in HTBE-Kulturen sind hingegen nicht eindeutig (s. Abb. 4.14 B). Diese Viren zeigten in zwei von drei Experimenten keinen Unterschied in der Sensitivität gegenüber IFN im Vergleich zu HK/68-WT. Da diese Kulturen aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt sind und zusätzlich noch Mucus auf die Oberfläche sezernieren, kann ein Einfluss der Rezeptorspezifität oder der NA auf die IFN-Sensitivität nicht ausgeschlossen werden. Jedoch zeigen die Daten des Virus HK/68-WT und seiner Mutante HK/68-H17R eindeutig, dass bei gleicher Rezeptorbindung und NA-Aktivität der Fusions-pH einen Vorteil für die Infektion darstellen kann, wenn der IFN-induzierte antivirale Status aktiviert wurde.

Zusätzliche Experimente unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt von Dr. Tatyana Matrosovich, in denen die Sensitivität gegenüber den Interferonen α und λ untersucht wurden, zeigten den gleichen Effekt (Daten nicht gezeigt). Die Sensitivität gegenüber einer Aktivierung der Zellen mit diesen Interferonen ist ebenfalls abhängig vom pH-Optimum der Fusion. Auch hier waren Viren mit einem hohen Fusions-pH weniger sensitiv gegenüber der IFN-Stimulation der Zellen als Viren mit geringem Fusions-pH.

Auch die Sensitivität der korrespondierenden Wildtyp-Isolate der rekombinanten Viren gegenüber IFN-induzierten Effektormolekülen ist abhängig vom pH des endosomalen Eintritts. Das pandemische Virus A/Hamburg/5/2009 (H1N1) und die hochpathogenen Viren

A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1) und A/Anhui/1/2013 (H7N9) wiesen die niedrigste Sensitivität gegenüber NH_4Cl auf während das saisonale Virus A/Memphis/14/1996 (H1N1) und das pandemische Virus A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) die höchste Sensitivität aufwiesen (s. Abb. 4.22). Somit entlassen das H5N1, das H7N9 und das pandemische Virus von 2009 ihre RNPs beim höchsten endosomal pH in das Zytoplasma. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der rekombinanten Viren, waren das H5N1-, das H7N9-Virus und das pandemische Virus von 2009 weniger sensitiv gegenüber einer IFN-Vorbehandlung der Zellen als das saisonale Virus A/Memphis/14/1996 und das pandemische Virus von 1968 (s. Abb. 4.23). Dies deutet darauf hin, dass auch bei nicht-rekombinanten Wildtyp-Viren der Fusions-pH einen signifikanten Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status haben kann, unabhängig von den 6 „internen“ Genen. Dieser hohe Fusions-pH könnte zumindest teilweise den schweren Krankheitsverlauf einer Infektion durch H5N1- und H7N9- Viren erklären, da diese effizienter in Anwesenheit der aktivierten angeborenen Immunantwort infizieren.

Dennoch muss man im Falle der nicht-rekombinanten Viren bedenken, dass hier auch interne Gene, wie z.B. das M2-Protein, den Fusions-pH beeinflussen können wie es Alvarado-Facundo et al. nachweisen konnte (Alvarado-Facundo et al., 2014). Der am besten untersuchte IFN-Antagonist von IAV ist das NS1-Protein. Die NS1-Proteine der nicht-rekombinanten Viren sind unterschiedlichen Ursprungs und können unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Da jedoch nur die initiale Infektion untersucht wird ist die antagonistische Funktion gegenüber IFN des NS1-Protein zu vernachlässigen (zusammengefasst in Marc, 2014). Andere IAV-Proteine, für die bekannt ist, dass sie in den frühen Phasen mit Faktoren der IFN-Antwort interagieren sind das PB2, welches mit RIG-I interagiert und das NP, welches mit MxA interagiert (Weber et al., 2015; zusammengefasst in Haller et al., 2015). Inwiefern diese Proteine der Wildtypisolate die Sensitivität gegenüber IFN beeinflussen müsste in weiteren Versuchen untersucht werden.

5.4.2 Einfluss der Rezeptorbindung auf die Virussensitivität gegenüber IFN während des Zelleintritts

Die getesteten rekombinanten Viren unterschieden sich nicht nur im Fusions-pH. So unterschieden sie sich des Weiteren in ihrer Rezeptorspezifität (s. Tab. 4.1). Deswegen sollte der Einfluss der Rezeptorbindung auf die Virussensitivität gegenüber dem antiviralen Status untersucht werden.

Dafür wurden Rezeptorbindungsmutanten des Virus A/Hong Kong/1/1968 hergestellt. Das Virus HK/68-R2 weist eine rein aviäre Rezeptorspezifität auf (Matrosovich et al., 2007). Die Mutation Y98F beeinflusst die Bindungsstärke an den Rezeptor, jedoch nicht die Spezifität (Martin et al., 1998).

Die Rezeptorbindungsmutanten unterscheiden sich leicht in ihrem pH-Optimum der Fusion (s. Tab. 4.3). Die verringerte Sensitivität des Virus HK/68-Y98F gegenüber NH_4Cl weist darauf hin, dass der Eintritt der RNPs ins Zytoplasma bei einem leicht höheren pH stattfindet. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass sich das HA1 durch eine schwächere Rezeptorbindung im Endosom schneller vom Rezeptor lösen kann und die Konformationsänderung früher initiiert wird. Andere Arbeiten wie die von Imai et al. und DuBois et al. konnten zeigen, dass Mutationen in der Rezeptorbindungsdomäne den Fusions-pH beeinflussen können (Imai et al., 2012; DuBois et al., 2011). Dabei zeigten sie, dass die Mutationen K216E und S221P an der Kontaktstelle zwischen den HA1-Monomeren den Fusions-pH ändern sowie dass der Wechsel in der Rezeptorspezifität über die Mutationen N224K und Q226L destabilisierend auf das HA wirkt. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status in A549-Zellen (s. Abb. 4.15). Die Ursache dafür könnte sein, dass obwohl kleine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber NH_4Cl bestehen, diese Unterschiede nicht groß genug sind, um die IFN-Sensitivität der Viren zu beeinflussen.

Wie bereits erwähnt kann die Rezeptorspezifität den Zelltropismus beeinflussen. So wurde in HTBE-Kulturen gezeigt, dass aviäre und humane Viren unterschiedliche Zielzellen infizieren (Matrosovich et al., 2004b; Thompson et al., 2006). Das HK/68-R2 Virus infizierte ausschließlich zilierte Zellen in HTBE-Kulturen wohingegen das HK/68-WT alle Zelltypen in HTBE-Kulturen infizierte (Matrosovich et al., 2007). Es ist durchaus denkbar, dass unterschiedliche Zelltypen im Atemwegsepithel unterschiedliche Reaktionen auf die IFN-Stimulation zeigen, indem sie zum Beispiel eine unterschiedlich starke Expression von IFITM-Proteinen aufweisen. Der durch die Rezeptorbindung vermittelte Zelltropismus könnte somit den Viren ermöglichen einer Immunantwort zu entgehen.

Auch ist es denkbar, dass unterschiedliche Zellen im Atemwegsepithel Unterschiede in ihrem endosomalen pH aufweisen. In immortalisierten Zelllinien wurde gezeigt, dass z.B. MDCK-Zellen einen niedrigeren endosomalen pH als A549-Zellen aufweisen (Zaraket et al., 2013). Somit könnten Viren mit niedrigem Fusions-pH A549-Zellen schlechter infizieren, da sie auf eine stärkere Ansäuerung des Endosoms angewiesen sind. Vero-Zellen weisen einen höheren endosomalen pH auf als MDCK-Zellen (Murakami et al., 2012). Für die in dieser Arbeit verwendeten ausdifferenzierten HTBE-Kulturen ist jedoch nicht bekannt, inwieweit sich zilierte und nicht-zilierte Zellen in der endosomalen Ansäuerung unterscheiden. Auch ist nicht bekannt, wie sich der endosomale pH im Vergleich zu MDCK-Zellen verhält.

Dennoch kann man spekulieren, dass die Rezeptorspezifität durch die Beeinflussung des Zelltropismus auch einen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber IFN haben kann. Es könnte sein, dass mögliche Unterschiede in der IFN-Sensitivität aufgrund der Rezeptorspezifität der Viren durch die Wahl des Zellsystems nicht detektierbar sind. Die Daten dieser Arbeit, die mit den Viren VN-H5N1 und Sh-H7N9 in IFN-vorstimulierten HTBE-Kulturen gewonnen wurden

(s. 4.6.5), weisen ebenfalls darauf hin, dass die Rezeptorspezifität für die Virussensitivität gegenüber IFN relevant sein könnte.

5.4.3 Einfluss der Neuraminidase auf die Virussensitivität gegenüber IFN während des Zelleintritts

Die rekombinanten Viren mit dem HA und der NA repräsentativer aviärer, humaner und zoonotischer Viren unterscheiden sich abgesehen von den Fusions- und Rezeptorbindungseigenschaften ebenfalls in der Herkunft der NA. Es stellte sich die Frage, ob auch die NA einen Einfluss auf die Virussensitivität gegenüber IFN hat. Dabei kann man vermuten, dass die NA aufgrund ihrer Sialidaseaktivität die Infektion signifikant beeinflussen kann. Weiterhin wurde bereits beobachtet, dass die NA auch einen Einfluss auf das pH-Optimum der Fusion haben kann (DuBois et al., 2011; Reed et al., 2010). Um dies zu überprüfen wurden rekombinante Viren verwendet, die das HA des pandemischen Virus von 2009 und NAs unterschiedlicher Herkunft besaßen. Diese Viren standen in unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden bereits vorher charakterisiert (Gerlach et al., 2012).

Der Austausch des NA-Gens hatte einen signifikanten Einfluss auf die Sensitivität der Viren gegenüber NH_4Cl (s. Abb. 4.16). Dies deutet darauf hin, dass die NA den Fusions-pH beeinflusst, was auch von DuBois et al. und Reed et al. gezeigt werden konnte (DuBois et al., 2011; Reed et al., 2010). Eine Erhöhung der NA-Aktivität resultierte bei ihnen in einem erhöhtem Fusions-pH. Durch die Sialidaseaktivität erleichtert die NA das Ablösen des HA1 vom Rezeptor. Bei einer erhöhten NA-Aktivität würde die Ablösung vom Rezeptor im Endosom schneller vermittelt werden. Dadurch könnte die HA-Konformationsänderung des HA-Trimers im Endosom früher initiiert werden, was in einem höheren Fusions-pH resultiert.

Der Effekt, den der Austausch der NA auf die Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten Status hat, ist gering (s. Abb. 4.17). Wahrscheinlich werden diese Unterschiede durch den durch die NA veränderten Fusions-pH verursacht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Austausch der NA durch andere als die hier getesteten NAs zu einem deutlicheren Unterschied in der Sensitivität der Viren gegenüber IFN führt. Die Verpackungseffizienz von verschiedenen NA-Genen könnte variieren, was auch das Lösen des HAs vom Rezeptor beeinflussen kann. Man muss des Weiteren bedenken, dass durch den Austausch des NA-Gens die Balance zwischen HA und NA verändert wird. So könnte es sein, dass man mit einem anderen HA einen deutlicheren Einfluss des NA-Genaustauschs auf die Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status beobachten könnte.

5.4.4 Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status nach mehreren Replikationszyklen

Um den Einfluss der Virussensitivität gegenüber IFN über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde das Viruswachstum der rekombinanten Viren über 72 h in Anwesenheit von IFN beobachtet (s. Abb. 4.20). Es konnte beobachtet werden, dass der Unterschied der Titer in unstimulierten und mit 10 bzw. 100 U IFN- β stimulierten Zellen beim Virus HK/68-17R geringer war als beim Virus HK/68-WT (s. Abb. 4.20). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Fusions-pH nicht nur bei der initialen Infektion einen Vorteil in IFN-stimulierten Zellen bietet, sondern auch über einen längeren Zeitraum.

Auch das H5N1-Virus kann in Anwesenheit von IFN effizient replizieren. Dahingegen replizieren die Viren Mem-H1N1, Sh-H7N9 und mal-H1N1 in Abwesenheit und Anwesenheit von IFN schlecht (s. Abb. 4.21). Die Replikationseffizienz dieser drei Viren ist insgesamt sehr schwach mit Titern von maximal $6,8 \cdot 10^5$ FFU/100 μ l. Wir wissen von den vorangegangenen Versuchen, dass Sh-H7N9 in Anwesenheit von IFN signifikant besser infiziert als Mem-H1N1 und mal-H1N1 (s. Abb. 4.12). Das Ausbleiben von Unterschieden bei multizyklischer Replikation könnte sich durch eine geringe Replikationseffizienz dieser Viren ergeben. Andererseits könnte dies auch bedeuten, dass die Rezeptorbindung und/ oder die NA-Aktivität einen entscheidenden Einfluss haben können, da diese für die initiale Infektion bzw. für das Abknospen von neu synthetisierten Viren eine entscheidende Rolle spielen (Yondola et al., 2011). Dennoch zeigt die Replikation der Viren HK/68-WT und HK/68-H17R, dass der Fusions-pH einen signifikanten Einfluss auf die Replikationseffizienz in Anwesenheit von IFN haben kann, wenn die Rezeptorbindungseigenschaften sowie die NA-Eigenschaften gleich sind.

5.4.5 Virussensitivität gegenüber IFITM-Proteinen

In dieser Arbeit wurden Unterschiede in der Virussensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status nachgewiesen, die abhängig vom Fusions-pH waren. Potentielle IFN-induzierte Inhibitoren der viralen Fusion sind die IFITM-Proteine. Für sie wurde gezeigt, dass sie die Infektion von Viren inhibieren, indem sie die Fusion der Viren im Endosom verhindern (Bailey et al., 2014; Brass et al., 2009b).

Der genaue Mechanismus, wie die Inhibition durch IFITM-Proteine vermittelt wird, ist noch nicht bekannt. Zum einen wird davon ausgegangen, dass die Fusion durch Änderung der Cholesterin-Homöostase beeinflusst wird (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013). Andere Publikationen wiederum beschreiben einen Cholesterin-unabhängigen Prozess der Inhibition (Wrensch, Winkler und Pöhlmann, 2014). Auch wurde gezeigt, dass IFITM-Proteine mit der Vakuolen Protonen-ATPase und Clathrin interagieren und vermutlich die Ansäuerung und das *Trafficking* von Endosomen

bzw. Pathogenen beeinflussen (Wee et al., 2012). Anafu et al. beschreiben ebenfalls, dass IFITM3 die Ansäuerung von Endosomen beeinflussen kann (Anafu et al., 2013). Beschrieben ist jedoch auch, dass die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran bei der Hemifusion, dem Beginn der Vermischung der äußeren Lipidschichten beider Membranen, gestoppt wird, wodurch es nicht zur vollständigen Fusion kommt und das Freisetzen der RNPs in das Zytoplasma verhindert wird (Desai et al., 2014). All diese Daten deuten darauf hin, dass die Effizienz der IFITM-vermittelten Inhibition der IAV-Infektion abhängig vom pH-Optimum der Fusion sein könnte.

Es bestätigte sich, dass sowohl die initiale Infektion (s. Abb. 4.18) als auch die multizyklische Replikation (s. Abb. 4.19) durch IFITM2- und IFITM3-Proteine Fusions-pH abhängig inhibiert wird. Auch hier zeigte sich, dass die Viren mit einem hohen Fusion-pH (HK/68-H17R, VN-H5N1 und Sh-H7N9) weniger stark durch die Expression von IFITM-Proteinen gehemmt werden als Viren mit einem niedrigen Fusions-pH (HK/68-WT, Mem-H1N1, mal-H1N1, mal-H2N2), was mit der Infektionsinhibition in Anwesenheit von IFN korreliert. Darüber, dass der Fusions-pH die Sensitivität gegenüber IFITM-Proteinen beeinflussen kann, wurde bereits spekuliert (Long, Benfield und Barclay 2014; Sun et al., 2016). Bisher fehlten jedoch eindeutige Daten, die diese Hypothese belegten. Die hier vorliegende Arbeit weist durch das Verwenden von Fusionsmutanten zum ersten Mal nach, dass die Sensitivität von IAV gegenüber humanen IFITM2- und IFITM3-Proteinen abhängig vom Fusions-pH sein kann.

Es scheint, dass ein hoher Fusions-pH ein Mechanismus ist die antivirale Wirkung von IFITM-Proteinen zu umgehen. IFITM2 und IFITM3 kolokalisieren mit Markern des späten Endosoms und des Lysosoms (Sun et al., 2016; Huang et al., 2011; Feeley et al., 2011). Es ist denkbar, dass Viren mit relativ hohem Fusions-pH, wie z.B. VN-H5N1 und Sh-H7N9, nicht in das Zellkompartiment gelangen in dem die IFITM-Proteine vorliegen, indem sie die Fusion schon im frühen Endosom einleiten. Bisher wurde vermutet, dass IAV ausschließlich im späten Endosom oder im Lysosom die Fusion einleiten (Grove und Marsh, 2011; Desai et al., 2014).

Für andere Virusfamilien wurde bereits gezeigt, dass sie die antivirale Wirkung von IFITM-Proteinen umgehen können, indem sie die Fusion schon im frühen Endosom induzieren. Dies wurde zum Beispiel für das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) gezeigt (zusammengefasst in Diamond und Farzan, 2013). Interessanterweise entgehen Arenaviren der Inhibition durch IFITM-Proteine (Brass et al., 2009), obwohl sie auch die Fusion im späten Endosom einleiten (zusammengefasst in Nunberg und York, 2012; Rojek und Kunz, 2008).

IFITM-Proteine könnten auch einen Einfluss auf den Zelltropismus von IAV haben. So infizieren H5N1-Viren humane Endothelzellen sehr effizient. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass dieser Endothelzelltropismus aufgrund der einzigartigen Affinität für sulfatierte Rezeptoren (s. 1.4.1) zustande kommt (Feldmann et al., 2000; Ocaña-Macchi et al., 2009; Zeng et al., 2012). Neuere Daten zeigen jedoch, dass in Endothelzellen IFITM3 konstitutiv exprimiert wird (Sun et al., 2016). Da unsere Daten zeigen, dass die Sensitivität von Viren gegenüber IFITM3 abhängig

vom Fusions-pH ist, kann man darüber spekulieren, dass H5N1- und auch H7N9-Viren das Endothel aufgrund ihres hohen Fusions-pH besser infizieren als saisonale humane IAV mit einem niedrigen Fusions-pH. Dies wird auch von Sun et al. vermutet und ihre Daten mit wildtypischen Viren deuten auch darauf hin (Sun et al., 2016).

Es gibt Vermutungen darüber, dass Polymorphismen in den Allelen der IFITM-Gene die Pathogenität von IAV im Menschen beeinflussen. Es wurde berichtet, dass eine Korrelation zwischen dem rs12252-C Allel, welches für eine trunkierte Version des IFITM3 Proteins codiert, und der Anfälligkeit von Menschen gegenüber einer IAV-Infektion besteht (Everitt et al., 2012; Yang et al., 2015). In vitro wurde gezeigt, dass sowohl die vollständige IFITM3-Version als auch die trunkierte Version in der Lage sind eine IAV-Infektion zu inhibieren (Williams et al., 2014). Somit sind prinzipiell beide Versionen in der Lage Infektionen zu inhibieren. Der Polymorphismus des rs12252-C Allels ist deswegen momentan Bestandteil kontroverser Diskussionen (López-Rodríguez et al., 2016). Inwiefern der Fusions-pH eine Rolle spielt in der Sensitivität von IAV-Virus gegenüber der trunkierten Version des IFITM3-Proteins, ist nicht bekannt.

Man kann vermuten, dass eine verringerte Sensitivität gegenüber IFITM-Proteinen und der IFN-vermittelten antiviralen Immunantwort in einer erhöhten Pathogenität resultiert. In aviären Spezies konnte der Einfluss des Fusions-pH auf die Pathogenität bereits demonstriert werden. In Enten und Hühnern führte eine Erhöhung des Fusions-pH zu einer erhöhten Pathogenität (Reed et al., 2010; DuBois et al., 2011). Enten und Hühner besitzen ein IFITM3-Analog, welches in der Lage ist die IAV-Infektion zu inhibieren (Blyth et al., 2016; Smith et al., 2013). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die erhöhte Pathogenität in Enten und Hühnern durch eine verringerte Sensitivität gegenüber IFITM3 oder anderer ISGs verursacht wird.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Fusions-pH auch die Virussensitivität gegenüber anderen ISGs beeinflusst. Ein möglicher Kandidat wäre die Cholesterin-25-Hydroxylase (CH25H), welche Cholesterin in 25-Hydroxycholesterol (25HC) umwandelt und dadurch die Membranfluidität innerhalb einer Zelle beeinflusst (Liu et al., 2013). Eine veränderte Membranfluidität könnte dazu führen, dass Viren mit unterschiedlichen Fusions-pH auch unterschiedlich stark auf diese veränderte Membranfluidität reagieren. Die inhibitorische Wirkung von 25HC auf die IAV-Replikation wurde bereits nachgewiesen und beruhte ebenfalls auf einer Inhibition der Fusion (Liu et al., 2013; Gold et al., 2014; Blanc et al., 2013). Bisher wurden jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Viren in ihrer Sensitivität gegenüber der CH25H getestet (Gold et al., 2014). Weiterhin ist der Effekt einer Depletion des CH25H-Gens auf eine IAV-Infektion nicht so prägnant wie die Depletion des IFITM3-Gens. Mäuse ohne CH25H sind immer noch in der Lage die IAV-Infektion zu kontrollieren (Gold et al., 2014), wohingegen für IFITM3-KO Mäuse die IAV-Infektion letal ist (Bailey et al., 2012). Somit hätte die CH25H nur

einen geringen Effekt auf die IAV-Infektion. Jedoch könnte die Sensitivität gegenüber der CH25H von IAV zumindest partiell zur Pathogenität der IAV beitragen.

Eine frühe Fusion der endosomalen mit der viralen Membran, z.B. im frühem Endosom, und die damit verbundene Freisetzung der RNP-Komplexe würde dazu führen, dass RNP-Komplexe früher durch zelluläre Sensoren, wie z.B. das RIG-I, detektiert werden könnten. Durch die Erkennung doppelsträngiger ,5-PPP-RNA durch das RIG-I, wie sie auch RNP-Komplexe von IAV besitzen (Weber et al., 2013; Ehrhardt et al., 2010), käme es zu einer IFN-Induktion und somit zu der Aktivierung der angeborenen Immunantwort. Wie unsere Daten jedoch zeigen, sind Viren mit einem hohen Fusions-pH weniger sensitiv gegenüber der IFN-induzierten antiviralen Antwort. Somit würde die frühe Erkennung nicht notwendigerweise in einer verstärkten bzw. früheren Inhibition resultieren.

Die Virussubtypen H5N1 und H7N9 können bei der Übertragung auf den Menschen eine schwere respiratorische Erkrankung auslösen, die auch zum Tode führen kann. Die genauen Ursachen für den schweren Krankheitsverlauf werden in der einzigartigen Rezeptorspezifität dieser Viren (Feldmann et al., 2000; Ocaña-Macchi et al., 2009; Zeng et al., 2012) sowie in den internen Genen, wie den Polymerasegenen oder NS1, gesucht (zusammengefasst in Fukuyama und Kawaoka, 2011; Hulse et al., 2004; Klenk et al., 2011). Diese Viren lösen einen Zytokinsturm aus, welcher vermutlich zur hohen Pathogenität beiträgt (de Jong et al., 2006; Cheng et al., 2010). Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass H5N1- und H7N9-Viren aufgrund ihrer geringen Sensitivität gegenüber IFITM2- und IFITM3-Proteinen eine höhere Pathogenität aufweisen. Auch deuten die Daten darauf hin, dass ein hoher Fusions-pH einen Vorteil für die Replikation bringen kann, wenn die IFN-Signalkaskade schon aktiviert wurde. Dennoch zeigt sich, dass IAV, die an den Menschen adaptiert sind, einen niedrigen Fusions-pH aufweisen (Scholtissek, 1985; Baumann et al., 2015; Beyer et al., 1986; Byrd-Leotis et al., 2015). Auch wurde gezeigt, dass das pandemische Virus von 2009 sich von einem relativ hohen Fusions-pH im Menschen zu einem Virus mit niedrigem Fusions-pH entwickelt hat (Russier et al., 2016). Die hochpathogenen Viren der Subtypen H5N1 und H7N9 haben hingegen einen hohen Fusions-pH (Scholtissek, 1985; Beyer et al., 1986; Daidoji et al., 2015). Somit sollte bei der Adaption an den Menschen der Fusions-pH sinken bzw. die Stabilität dieser Viren steigen. Daraus würde wiederum folgen, dass diese Viren sensitiver gegenüber IFITM-Proteinen und der IFN-vermittelten Immunantwort sind. Sollten die Viren ihre geringe Sensitivität gegenüber der angeborenen Immunantwort beibehalten, müsste dies durch adaptive Mutationen in anderen Proteinen, wie z.B. den Polymeraseproteinen oder dem NS1, geschehen.

Bei Transmissionsstudien, bei denen das H5N1-Virus an Säuger adaptiert wurde, traten HA-stabilisierende Mutationen auf (Herfst et al., 2012; Imai et al., 2012). Gleichzeitig waren diese Viren per Aerosole übertragbar. Diese Experimente deuten darauf hin, dass der Fusions-pH mit der Transmissionsroute korreliert und dass eine erhöhte Stabilität essentiell für eine effiziente

Transmission zwischen Säugern ist. Die Tatsache, dass sich das HA bei der Übertragung auf den Menschen zu einem stabilen HA entwickelt (Russier et al., 2016), sowie die Tatsache, dass aus Menschen isolierte Viren eine hohe Stabilität aufweisen (Scholtissek, 1985), deuten darauf hin, dass der hohe Fusions-pH und somit eine verringerte Sensitivität gegenüber dem IFN-induzierten antiviralen Status auf Dauer keinen evolutionären Vorteil für das Virus darstellt.

Wirtsfaktoren könnten ebenfalls den Fusions-pH signifikant beeinflussen. So könnte der Gewebetyp, in dem IAV replizieren, IAV selektieren, die einen hohen bzw. niedrigen Fusions-pH aufweisen. So wurde gezeigt, dass das humane nasale Epithel einen leicht aziden Fusions-pH aufweist (England et al., 1999; Washington et al., 2000). In wildlebenden Wasservögeln replizieren IAV im GIT (zusammengefasst in Webster et al., 1992). Auch hier kann man davon ausgehen, dass der Gewebs-pH einen Einfluss auf die IAV Replikation hat.

Die infizierte Zelle selbst könnte einen Einfluss auf die Selektion von IAV mit verschiedenen Fusions-pHs haben. Unterschiedliche Zelltypen können Unterschiede im endosomalen pH aufweisen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass bei der Adaption eines IAV an Vero-Zellen Mutationen auftraten, die das HA destabilisieren (Murakami et al., 2012). Somit wäre die Sensitivität gegenüber dem antiviralen Status nur einer von mehreren Faktoren, die einen Einfluss auf den Fusions-pH nehmen könnte.

Vorstellbar ist auch, dass bei einer Infektion verschiedene Subpopulationen von Viren auftreten, die sich im Fusions-pH unterscheiden. So könnten in den unteren Atemwegen, während einer laufenden Infektion, Viren mit hohem Fusions-pH vorkommen während in den oberen Atemwegen mit leicht azidem pH Viren mit niedrigem Fusions-pH vorkommen, die über Aerosole übertragen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass in einer infizierten Person verschiedene Quasispezies von IAV vorkommen und die Replikation in verschiedenen Bereichen der Lunge beeinflusst wird (Seidel et al., 2014). Zumeist werden jedoch Mutationen beschrieben, die vermutlich die Rezeptorbindung beeinflussen, wie z.B. die Positionen 222, 225 oder 187 im HA (Chen et al., 2010; Resende et al., 2015). Bisher gibt es noch keine Hinweise darauf, dass auch Quasispezies mit Unterschieden im Fusions-pH auftreten. Quasispezies mit einem hohen Fusions-pH könnten bei schon aktivierter Immunantwort besser replizieren und sich innerhalb eines Epithels effizienter verbreiten.

Diese Arbeit zeigt, dass die Sensitivität von IAV gegenüber dem IFN-induzierten Status und auch gegenüber einzelnen ISG-Produkten, wie der IFITM-Protein-Familie, abhängig vom Fusions-pH der Viren sein kann. Diese Erkenntnis kann man auch auf andere Virusfamilien, die im Endosom pH-abhängig die Fusion einleiten, übertragen. Beispiele für solche Viren sind die Flaviviren (zusammengefasst in Stiasny et al., 2011). Diese Arbeit gibt somit auch Hinweise darauf, dass andere Virusfamilien je nach pH-Optimum der Fusion weniger sensitiv gegenüber der Expression von IFITM-Proteinen sein könnten und dadurch ihre Pathogenität beeinflusst werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Air, G.M., Laver, W.G., 1989. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins* 6, 341–56. doi:10.1002/prot.340060402
- Alexander, D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3–13. doi:10.1016/S0378-1135(00)00160-7
- Ali, M., Lillehoj, E.P., Park, Y., Kyo, Y., Kim, K.C., 2011. Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions. *Proteome Sci.* 9, 4. doi:10.1186/1477-5956-9-4
- Alvarado-Facundo, E., Gao, Y., Ribas-Aparicio, R.M., Jiménez-Alberto, A., Weiss, C.D., Wang, W., 2014. Influenza M2 protein ion channel activity helps maintain the pandemic 2009 H1N1 hemagglutinin fusion competence during transport to the cell surface. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.03253-14
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y.J., Lee, J.H., Shi, M., Huang, I.-C., Farzan, M., Jung, J.U., 2013. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 13, 452–64. doi:10.1016/j.chom.2013.03.006
- Anafu, A.A., Bowen, C.H., Chin, C.R., Brass, A.L., Holm, G.H., 2013. Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry. *J. Biol. Chem.* 288, 17261–17271. doi:10.1074/jbc.M112.438515
- Anders, E.M., Hartley, C.A., Reading, P.C., Ezekowitz, R.A., 1994. Complement-dependent neutralization of influenza virus by a serum mannose-binding lectin. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 3), 615–22.
- Bailey, C.C., Huang, I.-C., Kam, C., Farzan, M., 2012. IFITM3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* 8, e1002909. doi:10.1371/journal.ppat.1002909
- Bailey, C.C., Zhong, G., Huang, I.-C., Farzan, M., 2014. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu. Rev. Virol.* 1, 261–283. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085537
- Barman, S., Adhikary, L., Chakrabarti, A.K., Kawaoka, Y., Nayak, D.P., Bernas, C., Kawaoka, Y., Nayak, D.P., 2004. Role of Transmembrane Domain and Cytoplasmic Tail Amino Acid Sequences of Influenza A Virus Neuraminidase in Raft Association and Virus Budding. *J. Virol.* 78, 5258–5269. doi:10.1128/JVI.78.10.5258
- Barman, S., Nayak, D.P., 2000. Analysis of the Transmembrane Domain of Influenza Virus Neuraminidase, a Type II Transmembrane Glycoprotein, for Apical Sorting and Raft Association Analysis of the Transmembrane Domain of Influenza Virus Neuraminidase, a Type II Transmembrane Glycoprotein. *J. Virol.* 74, 6538–6545. doi:10.1128/JVI.74.14.6538-6545.2000.Updated
- Baum, L.G., Paulson, J.C., 1991. The N2 Neuraminidase of Human Influenza Virus Has Acquired a Substrate Specificity Complementary to the Hemagglutinin Receptor Specificity. *Virology* 180, 10–15.
- Baumann, J., Mounogou Kouassi, N., Foni, E., Klenk, H.-D., Matrosovich, M., 2015. H1N1 Swine Influenza Viruses Differ from Avian Precursors by a higher pH Optimum of Membrane Fusion. *J. Virol.* 90, 1569–1577. doi:10.1128/JVI.02332-15
- Belgnaoui, S.M., Paz, S., Hiscott, J., 2011. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 564–572. doi:10.1016/j.coi.2011.08.001
- Belser, J.A., Gustin, K.M., Pearce, M.B., Maines, T.R., Zeng, H., Pappas, C., Sun, X., Carney, P.J., Villanueva, J.M., Stevens, J., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2013. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 0, 1–5. doi:10.1038/nature12391
- Beyer, W.E.P., Ruigrok, R.W.H., van Driel, H., Masurel, N., 1986. Influenza Virus Strains with a Fusion Threshold of pH 5.5 or Lower Are Inhibited by Amantadine. *Arch. Virol.* 181, 173–181.
- Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Kropp, K.A., Forster, T., Shui, G., Lacaze, P., Watterson, S., Griffiths, S.J., Spann, N.J., Meljon, A., Talbot, S., Krishnan, K., Covey, D.F., Wenk, M.R., Craigon, M., Ruzsics, Z., Haas, J., Angulo, A., Griffiths, W.J., Glass,

- C.K., Wang, Y., Ghazal, P., 2013. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity* 38, 106–118. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.004
- Blok, J., Air, G.M., 1982. Variation in the membrane-insertion and “stalk” sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase. *Biochemistry* 21, 4001–7.
- Blok, J., Air, G.M., Laver, W.G., Ward, C.W., Lilley, G.G., Woods, E.F., Roxburgh, C.M., Inglis, A.S., 1982. Studies on the size, chemical composition, and partial sequence of the neuraminidase (NA) from type A influenza viruses show that the N-terminal region of the NA is not processed and serves to anchor the NA in the viral membrane. *Virology* 119, 109–21.
- Blyth, G.A.D., Chan, F., Webster, R.G., Magor, E., 2016. Duck Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Mediates Restriction of Influenza Viruses. *J. Virol.* 90, 103–116. doi:10.1128/JVI.01593-15.Editor
- Borrego-Diaz, E., Peebles, M.E., Markosyan, R.M., Melikyan, G.B., Cohen, F.S., 2003. Completion of trimeric hairpin formation of influenza virus hemagglutinin promotes fusion pore opening and enlargement. *Virology* 316, 234–244. doi:10.1016/j.virol.2003.07.006
- Böttcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., Van Heel, M., Stark, H., 1999. Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett.* 463, 255–259. doi:10.1016/S0014-5793(99)01475-1
- Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H.-D., Garten, W., Matrosovich, M., 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J. Virol.* 80, 9896–8. doi:10.1128/JVI.01118-06
- Boycott, R., Klenk, H.-D., Ohuchi, M., 1994. Cell Tropism of Influenza Virus Mediated by Hemagglutinin Activation at the Stage of Virus Entry. *Virology* 203, 313–319.
- Bradley, K.C., Galloway, S.E., Lasanajak, Y., Song, X., Heimbarg-Molinaro, J., Yu, H., Chen, X., Talekar, G.R., Smith, D.F., Cummings, R.D., Steinhauer, D.A., 2011. Analysis of Influenza Virus Hemagglutinin Receptor Binding Mutants with Limited Receptor Recognition Properties and Conditional Replication Characteristics □. *J. Virol.* 85, 12387–12398. doi:10.1128/JVI.05570-11
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D.J., Xavier, R.J., Farzan, M., Elledge, S.J., 2009a. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243–54. doi:10.1016/j.cell.2009.12.017
- Brass, A.L., Huang, I., Benita, Y., John, S.P., Manoj, N., Feeley, E.M., Ryan, B., Weyer, J.L., Weyden, L. Van Der, Fikrig, E., Adams, D.J., Xavier, R.J., Farzan, M., Stephen, J., 2009b. IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus , West Nile Virus and Dengue Virus 139, 1243–1254.
- Bui, C., Bethmont, A., Chughtai, A.A., Gardner, L., Sarkar, S., Hassan, S., Seale, H., MacIntyre, C.R., 2016. A Systematic Review of the Comparative Epidemiology of Avian and Human Influenza A H5N1 and H7N9 – Lessons and Unanswered Questions. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 602–620. doi:10.1111/tbed.12327
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371, 37–43.
- Byrd-Leotis, L., Galloway, S.E., Agbogu, E., Steinhauer, D.A., 2015. Influenza Hemagglutinin (HA) Stem Region Mutations That Stabilize or Destabilize the Structure of Multiple HA Subtypes. *J. Virol.* 89, 4504–4516. doi:10.1128/JVI.00057-15
- Carr, C.M., Chaudhry, C., Kim, P.S., 1997. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14306–14313. doi:10.1073/pnas.94.26.14306
- Carr, C.M., Kim, P.S., 1993. A Spring-Loaded Mechanism for the Conformation Change of Influenza Hemagglutinin. *Cell* 73, 823–832. doi:10.1016/0092-8674(93)90260-W
- Cauthen, A.N., Swayne, D.E., Sekellick, M.J., Marcus, P.I., Suarez, D.L., 2007. Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J. Virol.* 81, 1838–47.

- doi:10.1128/JVI.01667-06
- Chen, C.-J., Chen, G.-W., Wang, C.-H., Huang, C.-H., Wang, Y.-C., Shih, S.-R., 2010. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J. Virol.* 84, 10051–62. doi:10.1128/JVI.00592-10
- Chen, H., Wen, X., To, K.K.W., Wang, P., Tse, H., Chan, J.F.W., Tsoi, H., Fung, K.S.C., Tse, C.W.S., Lee, R.A., Chan, K., Yuen, K., 2010. Quasispecies of the D225G Substitution in the Hemagglutinin of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Virus from Patients with Severe Disease in Hong Kong , China. *J. Infect. Dis.* 201, 1517–1521. doi:10.1086/652661
- Chen, J., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1999. N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA 2 subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8967–8972.
- Chen, Y., Liang, W., Yang, S., Wu, N., Gao, H., Sheng, J., Yao, H., Wo, J., Fang, Q., Cui, D., Li, Y., Yao, X., Zhang, Y., Wu, H., Zheng, S., Diao, H., Yia, S., Zhang, Y., Chan, K.-H., Tsoi, H.-W., Teng, J.L.-L., Song, W., Wang, P., Lau, S.-Y., Zheng, M., Chang, J.F.-W., To, K.K.-W., Chen, H., Li, L., Yuen, K.-Y., 2013. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry : clinical analysis and. *Lancet* 381, 1916–1925. doi:10.1016/S0140-6736(13)60903-4
- Cheng, X., Xu, Q., Song, E., Yang, C.-F., Kemble, G., Jin, H., 2010. The hemagglutinin protein of influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) contributes to hyperinduction of proinflammatory cytokines in human epithelial cells. *Virology* 406, 28–36. doi:10.1016/j.virol.2010.06.048
- Chutinimitkul, S., Herfst, S., Steel, J., Lowen, A.C., Ye, J., Riel, D. Van, Schrauwen, E.J.A., Bestebroer, T.M., Burke, D.F., Sutherland-cash, K.H., Whittleston, C.S., Russell, C.A., Wales, D.J., Smith, D.J., Jonges, M., Meijer, A., Koopmans, M., Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T., Osterhaus, A.D.M.E., García-sastre, A., Perez, D.R., Fouchier, R., 2010. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Affects Receptor Binding. *J. Virol.* 84, 11802–11813. doi:10.1128/JVI.01136-10
- Claas, E.C.J., Osterhaus, A.D.M.E., Beek, R. Van, Jong, J.C. De, Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., Webster, R.G., 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472–477.
- Cohen, M., Zhang, X.-Q., Senaati, H.P., Chen, H.-W., Varki, N.M., Schooley, R.T., Gagneux, P., 2013. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virol. J.* 10, 321. doi:10.1186/1743-422X-10-321
- Colman, P.M., 1994. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 3, 1687–96. doi:10.1002/pro.5560031007
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., Paulson, J.C., 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. doi:10.1006/viro.1994.1615
- Costa, T., Chaves, A.J., Valle, R., Darji, A., van Riel, D., Kuiken, T., Majó, N., Ramis, A., 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet. Res.* 43, 28. doi:10.1186/1297-9716-43-28
- Costello, D.A., Whittaker, G.R., Daniel, S., 2015. Variations in pH Sensitivity, Acid Stability, and Fusogenicity of Three Influenza Virus H3 Subtypes. *J. Virol.* 89, 350–60. doi:10.1128/JVI.01927-14
- Couceiro, J.N.S.S., Paulson, J.C., Baum, L.G., 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* 29, 155–165.
- Cox, N.J., Neumann, G., Donis, R.O., 2004. Orthomyxoviruses: influenza. *Eras* 2003, 634–698. doi:10.1002/9780470688618
- Cox, N.J., Subbarao, K., 2000. Global epidemiology of Influenza: Past and Present. *Annu. Rev. Med.* 407–421.
- Cross, K.J., Langley, W.A., Russell, R.J., Skehel, J.J., Steinhauer, D.A., 2009. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept. Lett.* 16, 766–78.
- Daidoji, T., Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Yasugi, M., Matiyama, H., Masuda, T., Arai, F.,

- Ohba, T., Honda, A., Ikuta, K., Nakaya, T., 2015. Avian Influenza Virus Infection of Immortalized Human Respiratory Epithelial Cells Depends upon a Delicate Balance between Hemagglutinin Acid Stability and Endosomal pH *. *J. Biol. Chem.* 290, 10627–10642. doi:10.1074/jbc.M114.611327
- Daniels, R.S., Downie, J.C., Hay, A.J., Knossow, M., Skehel, J.J., Wang, M.L., Wiley, D.C., 1985. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 40, 431–9.
- Daniels, R.S., Jeffries, S., Yates, P., Schild, G.C., Rogers, G.N., Paulson, J.C., Wharton, S.A., Douglas, A.R., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1987. The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies. *EMBO J.* 6, 1459–65.
- de Graaf, M., Fouchier, R., 2014. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 33, 823–841.
- de Jong, J.C., Claas, E.C.J., Osterhaus, A.D.M.E., Webster, R.G., Lim, W.L., 1997. A pandemic warning? *Nature* 389, 554. doi:10.1038/39221
- de Jong, M.D., Simmons, C.P., Thanh, T.T., Hien, V.M. V, Smith, G.J.D., Chau, T.N.B., Hoang, D.M., Van Vinh NV Chau, N., Khanh, T.H., Dong, V.C., Qui, P.T., Cam, B. Van, Ha, D.Q., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Chinh, N.T., Hien, T.T., Farrar, J., 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12, 1203–1207. doi:10.1038/nm1477
- de Vries, E., Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P.J.M., de Haan, C. a M., 2011. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog.* 7, e1001329. doi:10.1371/journal.ppat.1001329
- Desai, T.M., Marin, M., Chin, C.R., Savidis, G., Brass, A.L., Melikyan, G.B., 2014. IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion. *PLoS Pathog.* 10, e1004048. doi:10.1371/journal.ppat.1004048
- Diamond, M.S., Farzan, M., 2013. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 46–57. doi:10.1038/nri3344
- Diederich, S., Berhane, Y., Embury-hyatt, C., Hisanaga, T., Handel, K., Cottam-Birt, C., Ranadheera, C., Kobasa, D., Pasick, J., 2015. Hemagglutinin-Neuraminidase Balance Influences the Virulence Phenotype of a Recombinant H5N3 Influenza A Virus Possessing a Polybasic HA 0 Cleavage Site. *J. Virol.* 89, 10724–10734. doi:10.1128/JVI.01238-15.Editor
- DuBois, R.M., Zaraket, H., Reddivari, M., Heath, R.J., White, S.W., Russell, C.J., 2011. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity. *PLoS Pathog.* 7, e1002398. doi:10.1371/journal.ppat.1002398
- Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Glück, R., Vorherr, T., Brunner, J., 1996. H⁺ - induced Membrane Insertion of Influenza Virus Hemagglutinin Involves the HA2 Amino-terminal Fusion Peptide but Not the Coiled Coil Region. *J. Biol. Chem.* 271, 13417–13421.
- Easterday, B.C., Couch, R.B., 1975. Animal Influenza: Its Significance in Human infection - Summary of Influenza Workshop VI. *J. Infect. Dis.* 131, 602–612.
- Ehre, C., Worthington, E.N., Liesman, R.M., Grubb, B.R., Barbier, D., O’Neal, W.K., Sallenave, J.-M., Pickles, R.J., Boucher, R.C., 2012. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16528–33. doi:10.1073/pnas.1206552109
- Ehrhardt, C., Seyer, R., Hrincius, E.R., Eierhoff, T., Wolff, T., Ludwig, S., 2010. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect.* 12, 81–87. doi:10.1016/j.micinf.2009.09.007
- England, R.J.A., Homer, J.J., Knight, L.C., Ell, S.R., 1999. Nasal pH measurement : a reliable and repeatable parameter. *Clin. Otolaryngol.* 24, 67–68.
- Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., Wise, H.M., Kane, L., Goulding, D.A., Digard, P., Anttila, V., Baillie, J.K., Walsh, T.S., Hume, D. a, Palotie, A., Xue, Y., Colonna, V., Tyler-Smith, C., Dunning, J., Gordon, S.B., Smyth, R.L., Openshaw, P.J., Dougan, G., Brass, A.L., Kellam,

- P., 2012. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484, 519–23. doi:10.1038/nature10921
- Feeley, E.M., Sims, J.S., John, S.P., Chin, C.R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G.D., Ryan, B.J., Donis, R.O., Elledge, S.J., Brass, A.L., 2011. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog.* 7, e1002337. doi:10.1371/journal.ppat.1002337
- Feldmann, A., Schäfer, M.K., Garten, W., Klenk, H.-D., 2000. Targeted Infection of Endothelial Cells by Avian Influenza Virus A / FPV / Rostock / 34 (H7N1) in Chicken Embryos. *J. Virol.* 74, 8018–8027.
- Fukuyama, S., Kawaoka, Y., 2011. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 481–486. doi:10.1016/j.coi.2011.07.016
- Galloway, S.E., Reed, M.L., Russell, C.J., Steinhauer, D.A., 2013. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathog.* 9, e1003151. doi:10.1371/journal.ppat.1003151
- Gambaryan, A., Karasin, A., Tuzikov, A., Chinarev, A., Pazynina, G., Bovin, N., Matrosovich, M., Olsen, C., Klimov, A., 2005. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Res.* 114, 15–22. doi:10.1016/j.virusres.2005.05.005
- Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Desheva, J., Bovin, N., Matrosovich, M., Klimov, A., 2008. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Virol. J.* 5, 85. doi:10.1186/1743-422X-5-85
- Gambaryan, A.S., Matrosovich, M., 1992. A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J. Virol. Methods* 39, 111–23.
- Gambaryan, A.S., Matrosovich, T., Munster, V.J., Fouchier, R., Capua, I., Krauss, S., Webster, R.G., Bovin, N. V., Klenk, H.-D., Mikhail, M., 2012. Receptor-Binding Profiles of H7 Subtype Influenza Viruses in Different Host Species. *J. Virol.* 86, 4370–4379. doi:10.1128/JVI.06959-11
- Gambaryan, A.S., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A., Klimov, A., 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 344, 432–8. doi:10.1016/j.virol.2005.08.035
- Gambaryan, A.S., Yamnikova, S., Lvov, D., Tuzikov, A., Chinarev, A., Pazynina, G., Webster, R.G., Matrosovich, M., Bovin, N., 2005. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* 334, 276–83. doi:10.1016/j.virol.2005.02.003
- Gamblin, S.J., Skehel, J.J., 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 285, 28403–9. doi:10.1074/jbc.R110.129809
- Gao, H.-N., Lu, H.-Z., Cao, B., Du, B., Shang, H., Gan, J.-H., Lu, S.-H., Yang, Y.-D., Fang, Q., Shen, Y.-Z., Xi, X.-M., Gu, Q., Zhou, X.-M., Qu, H.-P., Yan, Z., Li, F.-M., Zhao, W., Gao, Z.-C., Wang, G.-F., Ruan, L.-X., Wang, W.-H., Ye, J., Cao, H.-F., Li, X.-W., Zhang, W.-H., Fang, X.-C., He, J., Liang, W.-F., Xie, J., Zeng, M., Wu, X.-Z., Li, J., Xia, Q., Jin, Z.-C., Chen, Q., Tang, C., Zhang, Z.-Y., Hou, B.-M., Feng, Z.-X., Sheng, J.-F., Zhong, N.-S., Li, L.-J., 2013. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N. Engl. J. Med.* 368, 2277–85. doi:10.1056/NEJMoa1305584
- Gao, R., Wang, D., Hu, W., Chen, J., Jie, Z., Zhu, W., Gao, Z., Xiang, N., Shen, Y., Yu, H., Li, D., Gao, G.F., Wu, G., Wang, Y., Yuan, Z., Shu, Y., 2013. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *N. Engl. J. Med.* 368, 1888–1897. doi:10.1056/NEJMoa1304459
- Garten, R., Davis, T., Russell, C., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C., Emery, S., Hillman, M., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D.F., Fouchier, R., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C., López-Gatell, H., Olivera, H., López, I., Myers, C.A., Faix, D., Blair, P., Yu, C., Keene, K., Dotson, P.D., Boxrud, D., Sambol, A., Abid, S.H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A., Stringer, D., Blevins, P., Demmler-Harrison,

- G., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H., Belongia, E., Clark, P., Beatrice, S., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C., Shaw, M., Jernigan, D., Uyeki, T., Smith, D., Klimov, A., Cox, N., 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197–201. doi:10.1126/science.1176225
- Garten, W., Bosch, F.X., Linder, D., Rott, R., Klenk, H.-D., 1981. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Virology* 115, 361–374.
- Garten, W., Braden, C., Arendt, A., Peitsch, C., Baron, J., Lu, Y., Pawletko, K., Hards, K., Steinmetzer, T., Böttcher-Friebertshäuser, E., 2015. Influenza virus activating host proteases: Identification, localization and inhibitors as potential therapeutics. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 375–383. doi:10.1016/j.ejcb.2015.05.013
- Gerlach, T., Kühling, L., Uhlenhorff, J., Laukemper, V., Matrosovich, T., Czudai-Matwich, V., Schwalm, F., Klenk, H.-D., Matrosovich, M., 2012. Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus. *Vaccine* 30, 7348–52. doi:10.1016/j.vaccine.2012.09.078
- Gold, E.S., Diercks, A.H., Podolsky, I., Podyminogin, R.L., Askovich, P.S., Treuting, P.M., Aderem, A., 2014. 25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1–6. doi:10.1073/pnas.1404271111
- Goraya, M.U., Wang, S., Munir, M., Chen, J.L., 2015. Induction of innate immunity and its perturbation by influenza viruses. *Protein Cell* 6, 712–721. doi:10.1007/s13238-015-0191-z
- Grove, J., Marsh, M., 2011. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.* 195, 1071–1082. doi:10.1083/jcb.201108131
- Gubareva, L., Webster, R.G., Hayden, F.G., 2001. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3403–3408. doi:10.1128/AAC.45.12.3403-3408.2001
- Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 2002. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J.* 21, 865–75. doi:10.1093/emboj/21.5.865
- Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89, 812–8. doi:10.1016/j.biochi.2007.04.015
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M., Kochs, G., 2015. Mx GTPases: Dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* 23, 154–163. doi:10.1016/j.tim.2014.12.003
- Harder, T.C., Teuffert, J., Starick, E., Gethmann, J., Grund, C., Fereidouni, S., Durban, M., Bogner, K., Neubauer-Juric, A., Repper, R., Hlinak, A., Engelhardt, A., Nöckler, A., Smietanka, K., Minta, Z., Kramer, M., Globig, A., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J., Beer, M., 2009. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in Frozen Duck Carcasses, Germany, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15. doi:10.3201/eid1502.080949
- Hay, A.J., Gregory, V., Douglas, A.R., Lin, Y.P., 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 356, 1861–1870. doi:10.1098/rstb.2001.0999
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L.C.S., Goodbourn, S., McCauley, J.W., Barclay, W.S., 2007. NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *J. Virol.* 81, 2318–2327. doi:10.1128/JVI.01856-06
- Herfst, S., Imai, M., Kawaoka, Y., Fouchier, R., 2014. Avian influenza virus transmission to mammals., in: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. pp. 137–55. doi:10.1007/82_2014_387
- Herfst, S., Schrauwen, E.J.A., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V.J., Sorrell, E.M., Bestebroer, T.M., Burke, D.F., Smith, D.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R., 2012. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336, 1534–41. doi:10.1126/science.1213362
- Hers, J.F., 1966. Disturbances of the ciliated epithelium due to influenza virus. *Am. Respir. Dis.* 93.

- Hillaire, M.L.B., van Eijk, M., Vogelzang-van Trierum, S.E., Fouchier, R., Osterhaus, A.D.M.E., Haagsman, H.P., Rimmelzwaan, G.F., 2014. Recombinant porcine surfactant protein D inhibits influenza A virus replication ex vivo. *Virus Res.* 181, 22–6. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.032
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., Webster, R.G., 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6108–13. doi:10.1073/pnas.100133697
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275–89.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 129–149. doi:10.1128/CMR.14.1.129
- Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S.P., Kawaoka, Y., 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J. Virol.* 68, 6074–8.
- Hsu, A.C.Y., Barr, I., Hansbro, P.M., Wark, P.A., 2011. Human influenza is more effective than avian influenza at antiviral suppression in airway cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 906–913. doi:10.1165/rcmb.2010-0157OC
- Huang, I.-C.C., Bailey, C.C., Weyer, J.L., Radoshitzky, S.R., Becker, M.M., Chiang, J.J., Brass, A.L., Ahmed, A.A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L.E., Boltz, D., Kuhn, J.H., Elledge, S.J., Bavari, S., Denison, M.R., Choe, H., Farzan, M., 2011. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog.* 7, e1001258. doi:10.1371/journal.ppat.1001258
- Huang, Q., Opitz, R., Knapp, E.-W., Herrmann, A., 2002. Protonation and Stability of the Globular Domain of Influenza Virus Hemagglutinin. *Biophys. J.* 82, 1050–1058. doi:10.1016/S0006-3495(02)75464-7
- Hulse, D.J., Webster, R.G., Russell, R.J., Perez, D.R., 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J. Virol.* 78, 9954–9964. doi:10.1128/JVI.78.18.9954
- Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S.C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E.A., Neumann, G., Kawaoka, Y., 2012. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486, 420–8. doi:10.1038/nature10831
- Ito, T., Couceiro, J.N.S.S., Kelm, S., Baum, G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Kida, H., Paulson, J.C., Robert, G., Kawaoka, Y., Baum, L.G., Webster, R.G., 1998. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *J. Virol.* 72, 7367–7373.
- Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., Dalton, R.M., Lo, A., Efsthathiou, S., Atkins, J.F., Firth, A.E., Taubenberger, J.K., Digard, P., 2012. An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science* (80-.). 337, 199–204. doi:10.1126/science.1222213
- Jin, H., Leser, G.P., Zhang, J., Lamb, R.A., 1997. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J.* 16, 1236–47. doi:10.1093/emboj/16.6.1236
- Johnson, A., Chen, L., Winne, E., Santana, W., Metcalfe, M.G., Mateu-petit, G., Ridenour, C., Hossain, M.J., Villanueva, J., Zaki, S.R., Williams, T.L., Cox, N.J., Barr, J.R., Donis, R.O., 2015. Identification of Influenza A/PR/8/34 Donor Viruses Imparting High Hemagglutinin Yields to Candidate Vaccine Viruses in Eggs. *PLoS One* 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0128982
- Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K.A., Davis, C.W., Sheehan, J.K., Pickles, R.J., 2013. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol.* 6, 379–92. doi:10.1038/mi.2012.81
- Kesimer, M., Kirkham, S., Pickles, R.J., Henderson, A.G., Alexis, N.E., Demaria, G., Knight, D., Thornton, D.J., Sheehan, J.K., 2009a. Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am. J. Physiol. Lung*

- Cell. Mol. Physiol. 296, L92–L100. doi:10.1152/ajplung.90388.2008
- Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O’Neal, W., Pickles, R.J., Sheehan, J.K., 2009b. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J.* 23, 1858–68. doi:10.1096/fj.08-119131
- Klenk, H.-D., 2012. Evolution und Infektionsbiologie neuer Influenza-A-Viren mit pandemischem Potenzial. *Bundesgesundheitsblatt* 15–21. doi:10.1007/s00103-012-1584-2
- Klenk, H.-D., Garten, W., Matrosovich, M., 2011. Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays* 33, 180–8. doi:10.1002/bies.201000118
- Klenk, H.-D., Rott, R., Orlich, M., Blödorn, J., 1975. Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology* 439, 426–439.
- Knowles, M.R., Boucher, R.C., 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 109, 571–577. doi:10.1172/JCI200215217
- Kobasa, D., Kodihalli, S., Luo, M., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Suzuki, Y., Suzuki, T., Kawaoka, Y., 1999. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* 73, 6743–51.
- Kobasa, D., Rodgers, M.E., Wells, K., Kawaoka, Y., Kobasa, D., Rodgers, M.E., Wells, K., 1997. Neuraminidase Hemadsorption Activity , Conserved in Avian Influenza A Viruses , Does Not Influence Viral Replication in Ducks. *Microbiology* 71.
- Krenn, B.M., Egorov, A., Romanovskaya-Romanko, E., Wolschek, M., Nakowitsch, S., Ruthsatz, T., Kiefmann, B., Morokutti, A., Humer, J., Geiler, J., Cinatl, J., Michaelis, M., Wressnigg, N., Sturlan, S., Ferko, B., Batishchev, O. V., Indenbom, A. V., Zhu, R., Kastner, M., Hinterdorfer, P., Kiselev, O., Muster, T., Romanova, J., 2011. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One* 6, e18577. doi:10.1371/journal.pone.0018577
- Lamblin, G., Lhermitte, M., Klein, A., Roussel, P., Van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., 1984. Carbohydrate chains from human bronchial mucus glycoproteins: a wide spectrum of oligosaccharide structures.
- Lamblin, G., Roussel, P., 1993. Airway mucins and their role in defence against micro-organisms. *Respir. Med.* 87, 421–426.
- Laver, W.G., Colman, P.M., Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Air, G.M., 1984. Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virology* 137, 314–23.
- Lazarowitz, S.G., Choppin, P.W., 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68, 440–454. doi:10.1016/0042-6822(75)90285-8
- Leibler, J.H., Otte, J., Roland-Holst, D., Pfeiffer, D.U., Magalhaes, R.S., Rushton, J., Graham, J.P., Silbergeld, E.K., 2009. Industrial Food Animal Production and Global Health Risks : Exploring the Ecosystems and Economics of Avian Influenza. *Ecohealth* 6, 58–70. doi:10.1007/s10393-009-0226-0
- Leikina, E., Mittal, A., Cho, M., Melikov, K., Kozlov, M.M., Chernomordik, L. V., 2004. Influenza Hemagglutinins Outside of the Contact Zone Are Necessary for Fusion Pore Expansion. *J. Biol. Chem.* 279, 26526–26532. doi:10.1074/jbc.M401883200
- Leyva-Grado, V.H., Hai, R., Fernandes, F., Belicha-Villanueva, A., Carter, C., Yondola, M.A., 2014. Modulation of an ectodomain motif in the influenza A virus neuraminidase alters tetherin sensitivity and results in virus attenuation in vivo. *J. Mol. Biol.* 426, 1308–21. doi:10.1016/j.jmb.2013.12.023
- Li, K., Markosyan, R.M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J.C., Gratton, E., Cohen, F.S., Liu, S.-L., 2013. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PLoS Pathog.* 9, e1003124. doi:10.1371/journal.ppat.1003124
- Limsuwat, N., Suptawiwat, O., Boonarkart, C., Puthavathana, P., Auewarakul, P., Wiriyarat, W., 2013. Susceptibility of Human and Avian Influenza Viruses to Human and Chicken Saliva. *J. Med. Virol.* 1–7. doi:10.1002/jmv
- Lin, Y.P., Wharton, S.A., Martín, J., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Steinhauer, D.A., 1997. Adaptation of egg-grown and transfectant influenza viruses for growth in mammalian

- cells: selection of hemagglutinin mutants with elevated pH of membrane fusion. *Virology* 233, 402–10.
- Linster, M., van Boheemen, S., de Graaf, M., Schrauwen, E.J.A., Lexmond, P., Mänz, B., Bestebroer, T.M., Baumann, J., van Riel, D., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., Matrosovich, M., Fouchier, R., Herfst, S., 2014. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell* 157, 329–39. doi:10.1016/j.cell.2014.02.040
- Liu, J., Stevens, D.J., Haire, L.F., Walker, P.A., Coombs, P.J., Russell, R.J., Gamblin, S.J., Skehel, J.J., 2009. Structures of receptor complexes formed by hemagglutinins from the Asian Influenza pandemic of 1957. *PNAS* 106, 17175–17180.
- Liu, Q., Liu, D.-Y., Yang, Z.-Q., 2013. Characteristics of human infection with avian influenza viruses and development of new antiviral agents. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 1257–69. doi:10.1038/aps.2013.121
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., Freiberg, A.N., Su, L., Lee, B., Cheng, G., 2013. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity* 38, 92–105. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.005
- Liu, Y., Childs, R.A., Matrosovich, T., Wharton, S., Palma, A.S., Chai, W., Daniels, R.S., Gregory, V., Uhlenhorff, J., Kiso, M., Klenk, H.-D., Hay, A., Feizi, T., Matrosovich, M., 2010. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *J. Virol.* 84, 12069–74. doi:10.1128/JVI.01639-10
- Lo-Guidice, J.-M., Merten, M.D., Lamblin, G., Porchet, N., Houvenaghel, M.-C., Figarella, C., Roussel, P., Perini, J., 1997. Mucins secreted by a transformed cell line derived from human tracheal gland cells. *Biochem. J.* 326, 431–437.
- Long, J.S., Benfield, C.T., Barclay, W.S., 2014. One-way trip: influenza virus' adaptation to gallinaceous poultry may limit its pandemic potential. *Bioessays* 37, 204–12. doi:10.1002/bies.201400133
- López-Rodríguez, M., Herrera-Ramos, E., Solé-Violan, J., Ruiz-Hernandez, J.J., Borderias, L., Horcajada, J.P., Lerma-Chippirraz, E., Rajas, O., Briones, M., Perez-Gonzalez, M.C., Garcia-Bello, M.A., Lopez-Granados, E., Rodriguez de Castro, F., Rodriguez-Gallego, C., 2016. IFITM3 and severe influenza virus infection . No evidence of genetic association. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1811–1817. doi:10.1007/s10096-016-2732-7
- Madec, F., Kuntz-Simon, G., Madec, F., 2009. Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health* 56, 310–25. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01236.x
- Mair, C.M., Ludwig, K., Herrmann, A., Sieben, C., 2014. Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1153–68. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.004
- Mangeat, B., Cavagliotti, L., Lehmann, M., Gers-Huber, G., Kaur, I., Thomas, Y., Kaiser, L., Piguet, V., 2012. Influenza virus partially counteracts restriction imposed by tetherin/BST-2. *J. Biol. Chem.* 287, 22015–29. doi:10.1074/jbc.M111.319996
- Marc, D., 2014. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 95, 2594–611. doi:10.1099/vir.0.069542-0
- Marcus, P.I., Ngunjiri, J.M., Sekellick, M.J., Wang, L., Lee, C.-W., 2010. In vitro analysis of virus particle subpopulations in candidate live-attenuated influenza vaccines distinguishes effective from ineffective vaccines. *J. Virol.* 84, 10974–10981. doi:10.1128/JVI.00502-10
- Martin, J., Wharton, S.A., Lin, Y.P., Takemoto, D.K., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Steinhauer, D.A., 1998. Studies of the Binding Properties of Influenza Hemagglutinin Receptor-Site Mutants. *Virology* 241, 101–111.
- Matrosovich, M., Gambaryan, A.S., Teneberg, S., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S., Karlsson, K. a, 1997. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233, 224–34. doi:10.1006/viro.1997.8580
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Carr, J., Roberts, N.A., Klenk, H.-D., 2003. Overexpression of the α -2 , 6-Sialyltransferase in MDCK Cells Increases Influenza Virus Sensitivity to

- Neuraminidase Inhibitors. *J. Virol.* 77, 8418–8425. doi:10.1128/JVI.77.15.8418
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., Klenk, H.-D., 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol. J.* 3, 63. doi:10.1186/1743-422X-3-63
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H., 2004a. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Society* 78, 12665–12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Gray, T., Roberts, N., Klenk, H.-D., 2004b. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4620–4. doi:10.1073/pnas.0308001101
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Uhendorf, J., Garten, W., Klenk, H.-D., 2007. Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. *Virology* 361, 384–90. doi:10.1016/j.virol.2006.11.030
- Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A.S., Klimov, A., Maria, R., Donatelli, I., Kawaoka, Y., 2000. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1 , H2 , and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1 , H2 , and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutini. doi:10.1128/JVI.74.18.8502-8512.2000.Updated
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1999. The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans , Chickens , and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties. *J. Virol.* 73, 1146–1155.
- Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., 2012. Solid-Phase Assays of Receptor-Binding Specificity, in: *Methods in Molecular Biology*. pp. 71–94. doi:10.1007/978-1-61779-621-0
- Maxfield, F.R., 1982. Weak Bases and Ionophores Rapidly and Reversibly Raise the pH of Endocytic Vesicles in Cultured Mouse Fibroblasts Quantitative Fluorescence Microscopy. *J. Cell Biol.* 676–681.
- Murakami, S., Horimoto, T., Ito, M., Takano, R., Katsura, H., Shimojima, M., Kawaoka, Y., 2012. Enhanced Growth of Influenza Vaccine Seed Viruses in Vero Cells Mediated by Broadening the Optimal pH Range for Virus Membrane Fusion. *J. Virol.* 1405–1410. doi:10.1128/JVI.06009-11
- Nair, H., Brooks, W.A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J.A., Madhi, S.A., Simmerman, J.M., Gordon, A., Buchy, P., Harris, E., Evans, V., Katayose, M., Gaur, B., Callaghan-gordo, C.O., Goswami, D., Arvelo, W., Venter, M., Briese, T., Tokarz, R., Widdowson, M., Mounts, A.W., Breiman, R.F., Feikin, D.R., Klugman, K.P., Olsen, S.J., Gessner, B.D., Wright, P.F., Rudan, I., Broor, S., Simões, E.A.F., Campbell, H., 2011. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 378, 1917–1930. doi:10.1016/S0140-6736(11)61051-9
- Narayana, S.K., Helbig, K.J., McCartney, E.M., Eyre, N.S., Bull, R.A., Eltahla, A., Lloyd, A.R., Beard, M.R., 2015. The Interferon-induced Transmembrane Proteins , IFITM1 , IFITM2 , and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry. *J. Biol. Chem.* 290, 25946–25959. doi:10.1074/jbc.M115.657346
- Nayak, D.P., Jabbar, M.A., 1989. Structural domains and organizational conformation involved in the sorting and transport of influenza virus transmembrane proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 465–501.
- Neumann, G., Kawaoka, Y., 2015. Transmission of influenza A viruses. *Virology* 480, 234–246. doi:10.1016/j.virol.2015.03.009
- Neumann, G., Noda, T., Kawaoka, Y., 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931–939. doi:10.1038/nature08157.Emergence
- Nicholls, J.M., 2013. The battle between influenza and the innate immune response in the human respiratory tract. *Infect. Chemother.* 45, 11–21. doi:10.3947/ic.2013.45.1.11
- Nicholls, J.M., Bourne, A.J., Chen, H., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2007. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir. Res.* 8, 73. doi:10.1186/1465-9921-8-73
- Nicholls, J.M., Chan, M.C.W., Chan, W.Y., Wong, H.K., Cheung, C.Y., Kwong, D.L.W., Wong, M.P., Chui, W.H., Poon, L.L.M., Tsao, S.W., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2007.

- Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat. Med.* 13, 147–9. doi:10.1038/nm1529
- Noda, T., Kawaoka, Y., 2010. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev. Med. Virol.* 380–391. doi:10.1002/rmv
- Nunberg, J.H., York, J., 2012. The Curious Case of Arenavirus Entry, and Its Inhibition. *Viruses* 4, 83–101. doi:10.3390/v4010083
- Ocaña-Macchi, M., Bel, M., Guzylack-Pirou, L., Ruggli, N., Liniger, M., McCullough, K.C., Sakoda, Y., Isoda, N., Matrosovich, M., Summerfield, A., 2009. Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells. *J. Virol.* 83, 12947–55. doi:10.1128/JVI.00468-09
- Ohuchi, M., Asaoka, N., Sakai, T., Ohuchi, R., 2006. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect.* 8, 1287–93. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.008
- Okamatsu, M., Motohashi, Y., Hiono, T., Tamura, T., Nagaya, K., Matsuno, K., Sakoda, Y., Kida, H., 2016. Is the optimal pH for membrane fusion in host cells by avian influenza viruses related to host range and pathogenicity? *Arch. Virol.* 161, 2–9. doi:10.1007/s00705-016-2902-z
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R., 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* (80-.). 312, 384–8. doi:10.1126/science.1122438
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., Compans, R.W., 1974. Characterization of Temperature Defective Sensitive Influenza Virus Mutants in Neuraminidase. *Virology* 61, 397–410.
- Park, H.E., Gruenke, J.A., White, J.M., 2003. Leash in the groove mechanism of membrane fusion. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1048–1053. doi:10.1038/nsb1012
- Paulson, J.C., de Vries, R.P., 2013. H5N1 receptor specificity as a factor in pandemic risk. *Virus Res.* 178, 99–113. doi:10.1016/j.virusres.2013.02.015
- Peiris, J.S.M., Yu, W.C., Leung, C.W., Cheung, C.Y., Ng, W.F., Nicholls, J.M., Ng, T.K., Chan, K.H., Lai, S.T., Lim, W.L., Yuen, K.Y., Guan, Y., 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363, 617–619. doi:10.1016/S0140-6736(04)15595-5
- Perreira, J.M., Chin, C.R., Feeley, E.M., Brass, A.L., 2013. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses. *J. Mol. Biol.* 425, 4937–55. doi:10.1016/j.jmb.2013.09.024
- Pulendran, B., Maddur, M.S., 2014. Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* doi:10.1007/82_2014_405
- Qi, X., Qian, Y.-H., Bao, C.-J., Guo, X., 2013. Probable person to person transmission of novel avian influenza A (H7N9) virus in Eastern China , 2013 : epidemiological investigation. *Br. Med. J.* 4752, 1–8. doi:10.1136/bmj.f4752
- Ramos, I., Bernal-Rubio, D., Durham, N., Belicha-Villanueva, A., Lowen, A.C., Steel, J., Fernandez-Sesma, A., 2011. Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J. Virol.* 85, 4421–31. doi:10.1128/JVI.02356-10
- Ramos, I., Krammer, F., Hai, R., Aguiler, D., Bernal-Rubio, D., Steel, J., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., 2013. H7N9 influenza viruses interact preferentially with α 2,3-linked sialic acids and bind weakly to α 2,6-linked sialic acids. *J. Gen. Virol.* 94, 2417–23. doi:10.1099/vir.0.056184-0
- Reed, M.L., Bridges, O.A., Seiler, P., Kim, J.-K., Yen, H.-L., Salomon, R., Govorkova, E.A., Webster, R.G., Russell, C.J., 2010. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity and transmissibility in ducks. *J. Virol.* 84, 1527–35. doi:10.1128/JVI.02069-09
- Resende, C.R., Motta, F.C., Born, P.S., Machado, D., Caetano, B.C., Brown, D., Siqueira, M.M., 2015. Phylogenetic analyses of influenza A (H1N1)pdm09 hemagglutinin gene during and after the pandemic event in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 36, 147–155. doi:10.1016/j.meegid.2015.09.007
- Roberts, K.L., Shelton, H., Scull, M., Pickles, R., Barclay, W.S., 2011. Lack of transmission of a human influenza virus with avian receptor specificity between ferrets is not due to decreased virus shedding but rather a lower infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* 92, 1822–31. doi:10.1099/vir.0.031203-0

- Rogers, G.N., D'Souza, B.L., 1989. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 173, 317–322. doi:10.1016/0042-6822(89)90249-3
- Rogers, N., Paulson, J.C., 1983. Receptor Determinants of Human and Animal Influenza Virus Isolates : Differences in Receptor Specificity of the H3 Hemagglutinin Based on Species of Origin. *Virology* 127, 361–373.
- Röhm, C., Zhou, N., Süss, J., Mackenzie, J., Webster, R.G., 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217, 508–516. doi:10.1006/viro.1996.0145
- Rojek, J.M., Kunz, S., 2008. Microreview Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cell. Microbiol.* 10, 828–835. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01113.x
- Rose, M.C., 2006. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 86, 245–278. doi:10.1152/physrev.00010.2005
- Rott, R., 1992. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet. Microbiol.* 33, 303–310. doi:10.1016/0378-1135(92)90058-2
- Rott, R., Klenk, H.-D., Orlich, M., Wang, M.L., Skehel, J., Wiley, D., 1984. Studies on the adaptation of influenza to MDCK cells. *EMBO J.* 3, 3329–3332.
- Russell, C.J., 2014. Acid-Induced Membrane Fusion by the Hemagglutinin Protein and Its Role in Influenza Virus Biology, in: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer international Publishing Switzerland, pp. 93–116. doi:10.1007/82
- Russier, M., Yang, G., Rehg, J.E., Wong, S.-S., Mostafa, H.H., Fabrizio, T.P., Barman, S., Krauss, S., Webster, R.G., Webby, R.J., Russell, C.J., 2016. Molecular requirements for a pandemic influenza virus: An acid-stable hemagglutinin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1636–1641. doi:10.1073/pnas.1524384113
- Savidis, G., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Meraner, P., Guo, Z., Green, S., Brass, A.L., 2016. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *CellReports* 15, 2323–2330. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.074
- Scharfman, A., Lamblin, G., Roussel, P., 1995. Interactions between human respiratory mucins and pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 836–839.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2015. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 513–545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Scholtissek, C., 1985. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine* 3, 215–8.
- Scholtissek, C., Ludwig, S., Fitch, W.M., 1993. Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Arch. Virol.* 131, 237–250.
- Segal, M.S., Bye, J.M., Sambrook, J.F., Gething, M.-J., 1992. Disulfide bond formation during the folding of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 118, 227–244.
- Seidel, N., Sauerbrei, A., Wutzler, P., Schmidtke, M., 2014. Hemagglutinin 222D / G Polymorphism Facilitates Fast Intra-Host Evolution of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Viruses. *PLoS Comput. Biol.* 9. doi:10.1371/journal.pone.0104233
- Shelton, H., Roberts, K.L., Molesti, E., Temperton, N., Barclay, W.S., 2013. Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. *J. Gen. Virol.* 94, 1220–9. doi:10.1099/vir.0.050526-0
- Shi, Y., Zhang, W., Wang, F., Qi, J., Wu, Y., Song, H., Gao, F., Bi, Y., Zhang, Y., Fan, Z., Qin, C., Sun, H., Liu, J., Haywood, J., Liu, W., Gong, W., Wang, D., Shu, Y., Wang, Y., Yan, J., Gao, G.F., 2013. Structures and Receptor Binding of Hemagglutinins from Human-Infecting H7N9 Influenza Viruses. *Science* (80-.). 342, 243–247.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., Kawaoka, Y., 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435–6. doi:10.1038/440435a
- Shori, D.K., Genter, T., Hansen, J., Koch, C., Wyatt, H., Kariyawasam, H.H., Knight, R.A., Hodson, M.E., Kalogeridis, A., Tsanakas, I., 2001. Altered sialyl- and fucosyl-linkage on mucins in cystic fibrosis patients promotes formation of the sialyl-Lewis X determinant on salivary MUC-5B and MUC-7. *Pflugers Arch.* 443 Suppl, S55-61. doi:10.1007/s004240100645

- Short, K.R., Richard, M., Verhagen, J.H., Riel, D. Van, Schrauwen, E.J.A., Brand, J.M.A. Van Den, Mänz, B., Bodewes, R., Herfst, S., 2015. One health , multiple challenges : The inter-species transmission of influenza A virus. *One Heal.* 1, 1–13.
doi:10.1016/j.onehlt.2015.03.001
- Silverman, R.H., 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 81, 12720–12729.
doi:10.1128/JVI.01471-07
- Skehel, J.J., Cross, K.J., Steinhauer, D., Wiley, D.C., 2001. Influenza fusion peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 623–626. doi:10.1042/BST0290623
- Skehel, J.J., Wiley, D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–69.
doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.531
- Smith, S., Weston, S., Kellam, P., Marsh, M., 2014. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Curr. Opin. Virol.* 4, 71–7. doi:10.1016/j.coviro.2013.11.004
- Smith, S.E., Gibson, M.S., Wash, R.S., Ferrara, F., Wright, E., Temperton, N., Kellam, P., Fife, M., 2013. Chicken Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Restricts Influenza Viruses and Lyssaviruses In Vitro. *J. Virol.* 87, 12957–12966. doi:10.1128/JVI.01443-13
- Steinhauer, D.A., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Hay, A.J., 1991. Amantadine selection of a mutant influenza virus containing an acid-stable hemagglutinin glycoprotein: evidence for virus-specific regulation of the pH of glycoprotein transport vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11525–9.
- Stevens, J., Corper, A.L., Basler, C.F., Taubenberger, J.K., Palese, P., Wilson, I.A., 2004. Structure of the Uncleaved Human H1 Hemagglutinin from the Extinct 1918 Influenza Virus. *Science* (80-.). 303, 1866–1870. doi:10.1126/science.1093373
- Stiasny, K., Fritz, R., Pangerl, K., Heinz, F.X., 2011. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* 41, 1159–1163. doi:10.1007/s00726-009-0370-4
- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.-D., Garten, W., 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11, 2407–14.
- Subbarao, K., Joseph, T., 2007. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 267–78. doi:10.1038/nri2054
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., Cox, N.J., 1998. Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. *Sciences (New. York).* 279, 393–396.
doi:10.1126/science.279.5349.393
- Sun, X., Shi, Y., Lu, X., He, J., Gao, F., Yan, J., Qi, J., Gao, G.F., 2013. Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. *Cell Rep.* 3, 769–78. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.025
- Sun, X., Zeng, H., Kumar, A., Belser, J.A., Maines, T.R., Tumpey, T.M., 2016. Constitutively expressed IFITM3 protein in human pulmonary endothelial cells poses an early infection block to human influenza viruses. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.01254-16
- Suzuki, T., Takahashi, T., Nishinaka, D., Murakami, M., Fujii, S., Hidari, K.I.-P.J., Miyamoto, D., Li, Y.-T., Suzuki, Y., 2003. Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide. *FEBS Lett.* 553, 355–359. doi:10.1016/S0014-5793(03)01045-7
- Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Robert, E., Jr, H., Chambers, T.M., Kiso, M., 2000. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *J. Virol.* 74, 11825–11831.
doi:10.1128/JVI.74.24.11825-11831.2000.Updated
- Swiecki, M., Omattage, N.S., Brett, T.J., 2013. BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol. Immunol.* 54, 132–9. doi:10.1016/j.molimm.2012.11.008
- Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K., Król, E., 2014. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim. Pol.* 61, 397–401. doi:Epub 2014 Sep 3
- Tamura, S., Kurata, T., 2004. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, 236–47.

- Tashiro, M., Ciborowski, P., Reinacher, M., Pulverer, G., Klenk, H.-D., Rott, R., 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157, 421–430. doi:10.1016/0042-6822(87)90284-4
- Taubenberger, J.K., Morens, D.M., 2009. Pandemic influenza- including a risk assessment of H5N1. *PMC* 28, 187–202.
- Thoennes, S., Li, Z.N., Lee, B.J., Langley, W.A., Skehel, J.J., Russell, R.J., Steinhauer, D.A., 2008. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* 370, 403–414. doi:10.1016/j.virol.2007.08.035
- Thompson, C.I., Barclay, W.S., Zambon, M.C., Pickles, R.J., 2006. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. *J. Virol.* 80, 8060–8. doi:10.1128/JVI.00384-06
- Thompson, W.W., Weintraub, E., Dhankhar, P., Cheng, P., Brammer, L., Meltzer, M.I., Bresee, J.S., Shay, D.K., 2009. Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods. *Influenza Other Respi. Viruses* 3, 37–49. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00073.x
- Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A., 2008. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 459–486. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702
- Tilley, A.E., Walters, M.S., Shaykhiev, R., Crystal, R.G., 2015. Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2, 379–406. doi:10.14440/jbm.2015.54.A
- Tong, S., Li, Y., Rivallier, P., Conrardy, C., Castillo, D.A.A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., Turmelle, A.S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M.R., Tang, K., Rowe, L.A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K.A., Cox, N.J., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., Donis, R.O., 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4269–74. doi:10.1073/pnas.1116200109
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L.-M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P.J., Gilbert, A.T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C.T., Paulson, J.C., Stevens, J., Rupprecht, C.E., Holmes, E.C., Wilson, I.A., Donis, R.O., 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
- Trebbien, R., Larsen, L.E., Viuff, B.M., 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol. J.* 8, 434. doi:10.1186/1743-422X-8-434
- Tripathi, S., White, M.R., Hartshorn, K.L., 2013. The amazing innate immune response to influenza A virus infection. *Innate Immun.* doi:10.1177/1753425913508992
- Uhlendorff, J., Matrosovich, T., Matrosovich, M., Klenk, H.-D., 2009. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. *Arch. Virol.* 945–957. doi:10.1007/s00705-009-0393-x
- van de Sandt, C.E., Kreijtz, J.H.C.M., Rimmelzwaan, G.F., 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* 4, 1438–76. doi:10.3390/v4091438
- van Poucke, S., Doedt, J., Baumann, J., Qiu, Y., Matrosovich, T., Klenk, H.-D., Van Reeth, K., Matrosovich, M., 2015. Role of Substitutions in the Hemagglutinin in the Emergence of the 1968 Pandemic Influenza Virus. *J. Virol.* 89, JVI.01292-15. doi:10.1128/JVI.01292-15
- van Riel, D., den Bakker, M.A., Leijten, L.M.E., Chutinimitkul, S., Munster, V.J., Wit, E. De, Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2010. Seasonal and Pandemic Human Influenza Viruses Attach Better to Human Upper Respiratory Tract Epithelium than Avian Influenza Viruses. *Am. J. Pathol.* 176, 1614–1618. doi:10.2353/ajpath.2010.090949
- van Riel, D., Munster, V.J., De Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2006. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* (80-.). 312, 399. doi:10.1126/science.1125548
- Varga, Z.T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., Palese, P., 2011. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at

- the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog.* 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002067
- Vasin, A. V., Temkina, O.A., Egorov, V. V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A., Kiselev, O.I., 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 185, 53–63. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.015
- Veit, M., Thaa, B., 2011. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Adv. Virol.* 2011, 370606. doi:10.1155/2011/370606
- Voynow, J.A., Mengr, B.K.R., Rubin, B.K., 2009. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135, 505–12. doi:10.1378/chest.08-0412
- Wagner, R., Matrosovich, M., Klenk, H.-D., 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 12, 159–66. doi:10.1002/rmv.352
- Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S., Klenk, H.-D., 2000. Interdependence of Hemagglutinin Glycosylation and Neuraminidase as Regulators of Influenza Virus Growth : a Study by Reverse Genetics. *J. Virol.* 74, 6316–6323.
- Wang, X., Hinson, E.R., Cresswell, P., 2007. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe* 2, 96–105. doi:10.1016/j.chom.2007.06.009
- Washington, N., Steele, R.J.C., Jackson, S.J., Bush, D., Mason, J., Gill, D.A., Pitt, K., Rawlins, D.A., 2000. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *Int. J. Pharm.* 198, 139–146.
- Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A.M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., García-Sastre, A., Weber, F., 2013. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe* 13, 336–46. doi:10.1016/j.chom.2013.01.012
- Weber, M., Sediri, H., Felgenhauer, U., Binzen, I., Bänfer, S., Jacob, R., Brunotte, L., García-Sastre, A., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Hornung, V., Kochs, G., Schwemmle, M., Klenk, H.-D., Weber, F., 2015. Influenza virus adaptation PB2-627K modulates nucleocapsid inhibition by the pathogen sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 17, 309–319. doi:10.1016/j.chom.2015.01.005
- Weber, M., Weber, F., 2014. RIG-I-like receptors and negative-strand RNA viruses: RLRly bird catches some worms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 621–628. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.05.004
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152–79.
- Wee, Y.S., Roundy, K.M., Weis, J.J., Weis, J.H., 2012. Interferon-inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function. *Innate Immun.* 18, 834–45. doi:10.1177/1753425912443392
- Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426–431. doi:10.1038/333426a0
- Wendel, I., Matrosovich, M., Klenk, H.-D., Virologie, I., 2015. SnapShot : Evolution of Human Influenza A Viruses. *Cell Host Microbe* 17. doi:10.1016/j.chom.2015.02.001
- Weston, S., Czieso, S., White, I.J., Smith, S.E., Wash, R.S., Diaz-soria, C., Kellam, P., Marsh, M., 2016. Alphavirus Restriction by IFITM Proteins. *Traffic* 17, 997–1013. doi:10.1111/tra.12416
- White, J., Matlin, K., Helenius, A.R.I., 1981. Cell Fusion by Semliki Forest, Influenza, and Vesicular Stomatitis Viruses. *J. Cell Biol.* 89, 1–6.
- WHO, 2016a. Influenza at the human-animal interface.
- WHO, 2016b. Tool for Influenza Pandemic Risk Assessment (TIPRA).
- WHO, 2016c. Influenza Update N ° 274 1–5.
- WHO, 2016d. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO , 2003-2016.
- WHO, 2011. Pandemic Influenza A (H1N1), Donor Report.
- Wiley, D.C., Skehel, J.J., Waterfield, M., 1977. Evidence from studies with a cross-linking

- reagent that the haemagglutinin of influenza virus is a trimer. *Virology* 79, 446–448. doi:10.1016/0042-6822(77)90371-3
- Williams, D.E.J., Wu, W.-L., Grotefend, C.R., Radic, V., Chung, C., Chung, Y.-H., Farzan, M., Huang, I.-C., 2014. IFITM3 Polymorphism rs12252-C Restricts Influenza A Viruses. *PLoS One* 9, e110096. doi:10.1371/journal.pone.0110096
- Wilson, I.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366–373. doi:10.1038/289366a0
- Wilson, W.R., Allansmith, M.R., 1976. Rapid, atraumatic method for obtaining nasal mucus samples. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 391–393.
- Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., Digard, P., 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* 83, 8021–31. doi:10.1128/JVI.00826-09
- Wit, E. De, Kawaoka, Y., Jong, M. De, Fouchier, R., 2008. Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus in mammals. *Vaccine* 26, D54–D58. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.072.Pathogenicity
- Wrensch, F., Winkler, M., Pöhlmann, S., 2014. IFITM proteins inhibit entry driven by the MERS-coronavirus spike protein: evidence for cholesterol-independent mechanisms. *Viruses* 6, 3683–98. doi:10.3390/v6093683
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., Gao, G.F., 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 22, 183–191. doi:10.1016/j.tim.2014.01.010
- Xiong, X., Martin, S.R., Haire, L.F., Wharton, S.A., Daniels, R.S., Bennett, M.S., McCauley, J.W., Collins, P.J., Walker, P. a, Skehel, J.J., Gamblin, S.J., 2013. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans. *Nature* 499, 496–9. doi:10.1038/nature12372
- Xu, R., Wilson, I.A., 2011. Structural Characterization of an Early Fusion Intermediate of Influenza Virus Hemagglutinin. *J. Virol.* 85, 5172–5182. doi:10.1128/JVI.02430-10
- Xu, R., Zhu, X., McBride, R., Nycholat, C.M., Yu, W., Paulson, J.C., Wilson, I.A., 2012. Functional balance of the hemagglutinin and neuraminidase activities accompanies the emergence of the 2009 H1N1 influenza pandemic. *J. Virol.* 86, 9221–32. doi:10.1128/JVI.00697-12
- Yamada, S., Shinya, K., Takada, A., Ito, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., Le, Q.M., Ebina, M., Kasai, N., Kida, H., Horimoto, T., Rivallier, P., Chen, L.M., Donis, R.O., Kawaoka, Y., 2012. Adaptation of a duck influenza A virus in quail. *J. Virol.* 86, 1411–20. doi:10.1128/JVI.06100-11
- Yang, X., Steukers, L., Forier, K., Xiong, R., Braeckmans, K., Van Reeth, K., Nauwynck, H., 2014. A Beneficiary Role for Neuraminidase in Influenza Virus Penetration through the Respiratory Mucus. *PLoS One* 9, e110026. doi:10.1371/journal.pone.0110026
- Yang, X., Tan, B., Zhou, X., Xue, J., Zhang, X., Wang, P., Shao, C., Li, Y., Li, C., Xia, H., Qiu, J., 2015. Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Genetic Variant rs12252 and Influenza Susceptibility and Severity : A Meta-Analysis. *PLoS One* 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0124985
- Yen, H., Liang, C., Wu, C., Forrest, H.L., Ferguson, A., Choy, K., Jones, J., Wong, D.D., Cheung, P.P., Hsu, C., Li, O.T., Yuen, K.M., Chan, R.W.Y., Poon, L.L.M., Chan, M.C.W., Nicholls, J.M., Krauss, S., Wong, C., Guan, Y., Webster, R.G., Webby, R.J., Peiris, M., 2011. Hemagglutinin – neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14264–9. doi:10.1073/pnas.1111000108
- Yondola, M.A., Fernandes, F., Belicha-Villanueva, A., Uccellini, M., Gao, Q., Carter, C., Palese, P., 2011. Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. *J. Virol.* 85, 2480–91. doi:10.1128/JVI.02188-10
- Yoon, S.-W., Webby, R.J., Webster, R.G., 2013. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 3–32. doi:10.1007/82
- Yu, W.C.L., Chan, R.W.Y., Wang, J., Travanty, E.A., Nicholls, J.M., Peiris, J.S.M., Mason, R.J., Chan, M.C.W., 2011. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and

- H1N1 viruses. *J. Virol.* 85, 6844–55. doi:10.1128/JVI.02200-10
- Yuen, K.Y., Chan, P.K.S., Peiris, M., Tsang, D.N.C., Que, T.L., Shortridge, K.F., Cheung, P.T., To, W.K., Ho, E.T.F., Sung, R., Cheng, A.F.B., 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351, 467–471.
- Zanin, M., Baviskar, P., Webster, R.G., Webby, R., 2016. The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell Host Microbe* 19, 159–168. doi:10.1016/j.chom.2016.01.001
- Zanin, M., Marathe, B., Wong, S., Yoon, S., Collin, E., Oshansky, C., Jones, J., Hause, B., Webby, R., 2015. Pandemic Swine H1N1 Influenza Viruses with Almost Undetectable Neuraminidase Activity Are Not Transmitted via Aerosols in Ferrets and Are Inhibited by Human Mucus but Not Swine Mucus. *J. Virol.* 89, 5935–5948. doi:10.1128/JVI.02537-14
- Zaraket, H., Bridges, O.A., Duan, S., Baranovich, T., Yoon, S.-W., Reed, M.L., Salomon, R., Webby, R.J., Webster, R.G., Russell, C.J., 2013a. Increased acid stability of the hemagglutinin protein enhances H5N1 influenza virus growth in the upper respiratory tract but is insufficient for transmission in ferrets. *J. Virol.* 87, 9911–22. doi:10.1128/JVI.01175-13
- Zaraket, H., Bridges, O.A., Russell, C.J., 2013b. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus replication and pathogenesis in mice. *J. Virol.* 87, 4826–34. doi:10.1128/JVI.03110-12
- Zeng, H., Pappas, C., Belser, J.A., Houser, K. V., Zhong, W., Wadford, D.A., Stevens, T., Balczon, R., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2012. Productive Replication of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses : Possible Involvement in the Pathogenesis of Human H5N1 Virus. *J. Virol.* 667–678. doi:10.1128/JVI.06348-11
- Zhang, J., Leser, G.P., Pekosz, A., Lamb, R.A., 2000. The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. *Virology* 269, 325–34. doi:10.1006/viro.2000.0228
- Zheng, W., Tao, Y.J., 2013. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett.* 587, 1206–1214. doi:10.1016/j.febslet.2013.02.048
- Zhu, H., Zhou, B., Fan, X., Lam, T.T.Y., Wang, J., Chen, A., Chen, X., Chen, H., Webster, R.G., Webby, R., Peiris, J.S.M., Smith, D.K., Guan, Y., 2011. Novel reassortment of Eurasian Avian-like and pandemic/2009 influenza viruses in swine: infectious potential to humans. *J. Virol.* 85, 10432–10439. doi:10.1128/JVI.05352-11

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: WIRTSSPEKTRUM UND WEGE DER INTERSPEZIESTRANSMISSION VON INFLUENZA-A-VIREN.....	6
ABBILDUNG 1.2: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES INFLUENZA-A-VIRUS.	7
TABELLE 1.1: GENESEGMENT, GRÖÖE UND FUNKTION DER INFLUENZA-A-PROTEINE DES VIRUS A/ANHUI/1/2013	9
ABBILDUNG 1.3: REPLIKATIONSZYKLUS EINES INFLUENZA-A-VIRUS.....	10
ABBILDUNG 1.4: HA-TRIMER VON A/AICHI/2/1968 (H3N2)..	11
ABBILDUNG 1.5: STRUKTUR DER INFLUENZA-REZEPTOREN.....	13
ABBILDUNG 1.6: BINDUNG DES HUMANEN REZEPTORS IN H2-MONOMER VON A/SINGAPORE/1/1957.....	15
ABBILDUNG 1.7: STRUKTUR DES HA-TRIMERS VON A/AICHI/2/1968 (H3N2) VOR UND NACH DER FUSION.	17
ABBILDUNG 1.8: AUFSICHT AUF DIE ENZYMATISCHE DOMÄNE UND DIE HÄMADSOPRTIONSDOMÄNE GEZEIGT ANHAND DES MODELS DES N2-TETRAMER VON A/TOKYO/3/1967.	20
ABBILDUNG 1.9: AUFBAU UND FUNKTION DES ATEMWEGSEPITHEL	26
TABELLE 2.1: REKOMBINANTE VIREN UND URSPRUNG DER EINZELNEN GENE	35
TABELLE 2.2: BEZEICHNUNG UND HERKUNFT DER MUCUSPROBEN	40
TABELLE 2.3: BEZEICHNUNG DER BOVINEN FETUINE UND DER POLYMERE.....	41
ABBILDUNG 3.1: HÄMAGGLUTININ-MONOMER VON A/HONG KONG/1/1968 MIT EINGEFÜGTEN MUTATIONEN.	49
ABBILDUNG 3.2: PRINZIP DES ACHT-PLASMID-SYSTEMS.....	52
ABBILDUNG 3.3: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES PLAQUEASSAYS DES REKOMBINANTEN VIRUS VN-H5N1 AUF MDCK-ZELLEN.....	56
ABBILDUNG 3.4: BESTIMMUNG DES $\text{pH}_{50\text{-HA}}$ BEI INAKTIVIERUNG DER VIREN DURCH NIEDRIGEN pH.....	58
ABBILDUNG 3.5: BESTIMMUNG DER IC_{50} BEI DER INHIBITION DER INFEKTION DURCH NH_4CL	59
ABBILDUNG 3.6: BESTIMMUNG DES pH_{50} BEI DER pH-INDUZIERTEN REDUKTION DER ABSORPTION.	61
ABBILDUNG 3.7: SCATCHARD-PLOT DER DIREKTEN BINDUNG VON FETUIN FÜR DAS VIRUS MAL-H1N1....	67
ABBILDUNG 3.8: BESTIMMUNG VON $\text{C}_{0,8}$ UND $\text{X}_{0,8}$	73
ABBILDUNG 3.9: BESTIMMUNG VON $\text{X}_{50\%}$ DER MUCUSFRAKTIONEN IM FETUIN-BINDUNGS-INHIBITIONS- ASSAY.	75
TABELLE 4.1: REZEPTORBINDUNGSEIGENSCHAFTEN DER REKOMBINANTEN VIREN.	77
TABELLE 4.2: VIRUSEIGENSCHAFTEN: INHIBITION DURCH NH_4CL , pH DER KONFORMATIONSÄNDERUNG, pH-STABILITÄT	80
ABBILDUNG 4.1: WACHSTUMSKINETIKEN IN A) CALU3-ZELLEN, B) HTBE-KULTUREN, C) UND D) HAEC- KULTUREN.	81
ABBILDUNG 4.2: INHIBITION REKOMBINANTER VIREN DURCH HUMANEN BRONCHIALEN MUCUS IN MDCK- ZELLEN.....	84
ABBILDUNG 4.3: INFEKTIONSEFFIZIENZ VON MEM-H1N1 UND MAL-H1N1 NACH NA-BEHANDLUNG VON MDCK-ZELLEN.	85
ABBILDUNG 4.4: VERTEILUNG VON SIALINSÄUREN IN BRONCHIALEM (HTBE-1) UND HNE-MUCUS.	86
ABBILDUNG 4.5: INHIBITION REKOMBINANTER VIREN DURCH HUMANEN BRONCHIALEN MUCUS (HTBE-1) IN AN- UND ABWESENHEIT DES NA-INHIBITORS OSELTAMIVIRCARBOXYLAT (+ OC) IN MDCK- ZELLEN.....	87
ABBILDUNG 4.6: NEUTRALISATION DURCH HUMANEN BRONCHIALEN MUCUS IN MDCK- UND MDCK- SIAT-ZELLEN.	88
ABBILDUNG 4.7: INHIBITION DER VIRUSINFEKTION DURCH HUMANEN BRONCHIALEN MUCUS (HTBE-1) IN CALU3-ZELLEN.	89
ABBILDUNG 4.8: INHIBITION DER VIRUSINFEKTION DURCH HUMANEN BRONCHIALEN MUCUS IN A) MDCK- ZELLEN UND B) HTBE-KULTUREN.	90
ABBILDUNG 4.9: BINDUNGSINHIBITION DURCH NASALEN UND BRONCHIALEN (HTBE-1, HTBE-2) MUCUS.	92

ABBILDUNG 4.10: RELATIVE BINDUNG EINES HRP-FETUINS IN ANWESENHEIT UNTERSCHIEDLICH VORBEHANDELTEN HUMANER BRONCHIALER MUCUSPROBEN.....	94
ABBILDUNG 4.11: VIRUSINHIBITION DURCH DEN UZ-ÜBERSTAND UND DAS UZ-PELLET VERSCHIEDENER MUCUSPROBEN.....	96
ABBILDUNG 4.12: INHIBITION DER INFEKTION REKOMBINANTER 2:6-VIREN NACH IFN-STIMULATION VON A549-ZELLEN UND CALU3-ZELLEN.	97
TABELLE 4.3: FUSIONSEIGENSCHAFTEN DER REKOMBINANTEN HK/68 VIREN.....	99
ABBILDUNG 4.13: INHIBITION DER INFEKTION REKOMBINANTER FUSIONSMUTANTEN IN IFN- VORSTIMULIERTEN A549-ZELLEN UND CALU3-ZELLEN.	100
ABBILDUNG 4.14: SENSITIVITÄT REKOMBINANTER VIREN GEGENÜBER IFN-B IN HAEC-; HTBE- KULTUREN.	101
ABBILDUNG 4.15: INHIBITION DER INFEKTION DER REZEPTORMUTANTEN DURCH IFN IN A549-ZELLEN.	103
ABBILDUNG 4.16: INHIBITION DER INFEKTION REKOMBINANTER VIREN MIT UNTERSCHIEDLICHER NA DURCH NH ₄ CL.....	104
ABBILDUNG 4.17: INHIBITION DER INFEKTION REKOMBINANTER VIREN MIT UNTERSCHIEDLICHER NA DURCH IFN-INDUZIERTEN EFFEKTORMOLEKÜLE IN A549-ZELLEN.	105
ABBILDUNG 4.18: TITERREDUKTION REKOMBINANTER VIREN BEI ÜBEREXPRESSION VON HUMANEN IFITM2 UND IFITM3 NACH EINEM REPLIKATIONSZYKLUS.....	106
ABBILDUNG 4.19: VERÄNDERUNG DER PLAQUEGRÖÖE NACH INFEKTION VON IFITM2- UND IFITM3- EXPRIMIERENDEN ZELLEN.	108
ABBILDUNG 4.20: REPLIKATION VON FUSIONSMUTANTEN IN CALU3-ZELLEN IN ANWESENHEIT VON IFN-B.	109
ABBILDUNG 4.21: REPLIKATION REKOMBINANTER VIREN IN CALU3-ZELLEN IN ANWESENHEIT VON IFN-B.	110
ABBILDUNG 4.22: INHIBITION DER VIRUSINFEKTION DURCH NH ₄ CL.....	112
ABBILDUNG 4.23: INHIBITION DER INFEKTION NICHT-REKOMBINANTER VIREN IN IFN-VORSTIMULIERTEN A549-ZELLEN.	113
TABELLE 8.1: TITER NACH EINZYKLISCHER REPLIKATION UND PLAQUE-TITER ALLER REKOMBINANTEN UND NICHT-REKOMBINANTEN VIREN IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN.	XV

8 Anhang

8.1 Virustiter

Tabelle 8.1: Titer nach einzyklischer Replikation und Plaque-Titer aller rekombinanten und nicht-rekombinanten Viren in verschiedenen Zelllinien. n.b.: nicht bestimmt

Virus	Einzyklische Replikation MDCK-Zellen (FFU/100 µl)	Einzyklische Replikation A549-Zellen (FFU/100 µl)	Plaque-Titer MDCK-Zellen (PFU/ml)
<i>Mem-H1N1</i>	$1,3 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$
<i>mal-H1N1</i>	$2,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^7$
<i>mal-H2N2</i>	$9,3 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^7$
<i>mal-H7N1</i>	$6,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
<i>VN-H5N1</i>	$2,6 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^6$	$9,3 \cdot 10^7$
<i>Sh-H7N9</i>	$1,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$
<i>HK/68-WT</i>	$3,2 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^8$
<i>HK/68-H17R</i>	$3,1 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$
<i>HK/68-H17Y</i>	$1,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^8$
<i>HK/68-K82T</i>	$3,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$7,1 \cdot 10^8$
<i>HK/68-Y98F</i>	$3,3 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^8$
<i>HK/68-R2</i>	$9,2 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^8$
<i>pdm09</i>	$7,6 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^5$
<i>pdm09-sw/Iowa</i>	$3,1 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$
<i>pdm09-Thailand</i>	$3,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$
<i>pdm09-dk/Bavaria</i>	$1,1 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^6$
<i>pdm09-human/Memphis</i>	$5,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$
Nicht-rekombinante Viren			
<i>A/Memphis/14/1996 (H1N1)</i>	$5,6 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	n.b.
<i>A/Hamburg/5/2009 (H1N1)</i>	$9,4 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$	n.b.
<i>A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)</i>	$9,8 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	n.b.
<i>A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1)</i>	$9,6 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^4$	n.b.
<i>A/Anhui/1/2013 (H7N9)</i>	$6,5 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	n.b.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CH25H	Cholesterol-25-Hydroxylase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Enzymatische Domäne
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alii
FCS	Fötales Kälberserum
FFU	<i>Focus forming units</i>
GP	Glykoprotein
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	hour
HA	Hämagglutinin
HAD	Hämaadsorptionsdomäne
HAEC	<i>Human airway epithelial cells</i>
HAT	<i>Human airway trypsin-like protease</i>
HAU	Hämagglutinierende Einheiten
HPAI	<i>Highly pathogenic avian influenza</i>
hRBC	humane rote Blutzellen
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HTBE	<i>Human trachea-bronchial epithelial cells</i>
IAV	Influenza-A-Viren
IC	Inhibitorische Konzentration
IFITM	<i>Interferon induced transmembrane protein</i>
IFN	Interferon
IKK	<i>IκB kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factors</i>

IU	inhibitorische Einheit
LPAIV	<i>Low pathogenic avian influenza virus</i>
M	Molar
M1/2	Matrixprotein 1/2
MAL-I	<i>Maackia amurensis lectin I</i>
MAL-II	<i>Maackia amurensis lectin II</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canin kidney</i>
MEM	<i>Miniumum essential medium</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	Neuraminidase
n.b.	nicht bestimmt
NEP	<i>Nuclear export protein</i>
NES	<i>Nuclear export sequence</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>Nuclear Localization sequence</i>
nm	Nanometer
NP	Nucleoprotein
NS1/2	Nichtstrukturprotein 1/2
OAS	<i>Oligoadenylate synthetase</i>
PA	<i>Poylemrse acid</i>
PB1	<i>Polymerase basic 1</i>
PB2	<i>Polymerase basic 2</i>
PBS	<i>Phophate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>Plaque forming units</i>
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
RBD	Rezeptorbindungsdomäne

RIG-I	<i>Retionic acid-inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleinprotein
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunden
SNA	<i>Sambucus nigra lectin</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMD	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMPRSS2/4	<i>Transmembran Protease Serin S2/4</i>
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl Keton
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TSS	Transformation and Storage solution
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WHO	<i>World health organisation</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8.3 Aminosäureabkürzungen

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Try	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.4 Publikationen

Gerlach T., Kühling L., Uhendorff J., Laukemper V., Matrosovich T., Czudai-Matwich V., Schwalm F., Klenk HD., Matrosovich M., 2012. „Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus.“Vaccine. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.078

Gerlach T., Hensen L., Matrosovich T., Bergmann J., Winkler M., Peteranderl C., Klenk H.-D., Weber F., Herold S., Pöhlmann S., Matrosovich M.

„pH-optimum of hemagglutinin-mediated membrane fusion determines sensitivity of influenza A viruses to the interferon-induced antiviral state and IFITMs“,Journal of Virology 2017. doi: 10.1128/JVI.00246-17.

8.5 Präsentationen

Gerlach T., Hensen L., Matrosovich T., Wolf J., Winkler M., Peteranderl C., Klenk H.-D., Weber F., Herold S., Pöhlmann S., Matrosovich M.

"pH-optimum of hemagglutinin-mediated membrane fusion determines influenza virus sensitivity to interferon-induced antiviral state"

GFV-Tagung, 22.-25. März 2017 in Marburg

Vortrag

Gerlach T., Hensen L., Matrosovich T., Wolf J., Winkler M., Weber F., Klenk H.-D., Herold S., Pöhlmann S., Matrosovich M.

“Influenza virus sensitivity to interferon-induced antiviral state depends on pH optimum of hemagglutinin-mediated membrane fusion”

Influenza 2016, 13. – 16. September 2016 in Oxford, Vereinigtes Königreich

Poster Präsentation

Gerlach T., Matrosovich T., Klenk H.-D., Matrosovich M.

“Inhibition of avian and human influenza viruses by human airway mucins.”

5th ESWI Influenza Conference, 14. - 17. September 2014 in Riga, Lettland

Vortrag

Gerlach T., Kühling L., Matrosovich T., Schwalm F., Klenk H.-D., Matrosovich M.

“Characterization of 7:1 gene reassortants of H1N1/09 pandemic influenza virus containing different N1 neuraminidases”

3rd International Influenza Meeting. 2. – 4. September 2012 in Münster, Deutschland

Poster Präsentation

8.6 Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren:

Bauer, Bauer, Becker, Brehm, Bremmer, Bröring, Daut, del Rey, Elsässer, Feuser, Garten, Garn, Glorius, Hassel, Huber, Jacob, Kaufmann, Klenk, Koolman, Lill, Lohoff, Maisner, Matrosovich, Moll, Mühlhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Plant, Preißig-Müller, Renz, Röhm, Schäfer, Schmidt, Slenzcka, Suske, Visekruna, Weihe, Westermann, Wrocklage, Yu

8.7 Danksagung

Du mußt dich zu sehr vielen Dingen,
Willst du sie tun, geradezu zwingen!
Trotzdem wirkt das – was dir gelungen –
Oft zwingend leicht und ungezwungen.

Zwang, Heinz Erhardt

Mein erster Dank gilt Dr. Mikhail Matrosovich, der mir nach meiner Diplomarbeit die Gelegenheit gab, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Er half mit seinem enormen Fachwissen, die Arbeit in eine Richtung zu lenken, die ich vorher nicht erahnt hatte. Ich habe sehr viel von ihm gelernt und bin ihm dafür überaus dankbar.

Professor Dr. Klenk möchte ich für seine fachliche Expertise und für seine stets guten Vorschläge zu meinem Projekt danken. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass ich mit seiner Hilfe am „Virology course“ des Hong Kong Pasteur Institute teilnehmen konnte.

Professor Dr. Friedemann Weber möchte ich ebenfalls für seine fachliche Expertise, gerade auf dem Gebiet der angeborenen Immunantwort, danken.

Dr. Tatyana Matrosovich danke ich für ihre große Hilfe mit den HTBE-Kulturen und für viele andere methodische Hilfestellungen.

Unseren Kooperationspartnern Dr. Michael Winkler, Professor Dr. Stefan Pöhlmann danke ich für die Bereitstellung der IFITM-exprimierenden Zellen. Professor Dr. Susanne Herold und ihrer Gruppe sowie Professor Dr. Stefan Gattenloehner und Dr. Biruna Witte danke ich für die Isolation und zur Verfügungstellung der primären AEC-Kulturen.

Ein großer Dank gilt Dr. Jan Baumann, der in all den gemeinsamen Jahren, die wir im und auch außerhalb des Labors verbracht haben, zu einem guten Freund geworden ist. Seine Hilfe in Momenten, in denen man mal nicht weiterwusste, war Gold wert.

Meinen Bachelor-Studenten Luca Hensen und Eva Mudry möchte ich für ihre engagierte Arbeit und Motivation danken, da ohne ihre Arbeit einige Erkenntnisse nicht entstanden wären. Es war ein Vergnügen sie zu betreuen. An dieser Stelle möchte ich auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Matrosovich, Johanna West, Juliane Röder, Janina Jansen, Jana Beicht, Dr. Volker Czudai-Matwich und Ludmila Enns danken, da es durch die sehr gute Arbeitsatmosphäre, ständige Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft immer wieder Spaß gemacht hat zur Arbeit zu gehen. Auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Nancy Mounogou-Kouassi, Maiwenn Bergez und Dr. Isabel Wendel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Mitarbeit.

Ich möchte mich auch bei allen geduldigen Korrektoren, Dr. Jan Baumann, Dr. Michaela Gerlach, Alexander Köhler, Johanna West und meinen Schwestern, Barbara und Dominique, bedanken.

Den Kollegen des Instituts für Virologie möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung danken, ohne die manches Experiment nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit vom Studium bis zum Abschluss meiner Doktorarbeit moralisch, aber auch mit Naturalien, unterstützt hat. Vielen Dank!

Ich möchte auch allen meinen Freunden, die mir immer wieder mal die Gelegenheit gaben von der Doktorarbeit abzuschalten, sei es durch Kochabende, Ausflüge oder Ähnliches, herzlich danken.